

MTA Doktori Pályázat

Doktori Értekezés

**PROTEOLYTICUS ENZIMRENDSZEREK ÉS
SEJTKINETIKAI PARAMÉTEREK VIZSGÁLATA
EMÉSZTŐSZERVI BETEGSÉGEKBEN**

Dr. Hersényi László

Budapest, 2008

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	6
1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK	8
2. CÉLKITŰZÉSEK	14
3. BETEGANYAG, MÓDSZEREK	15
3.1. Cisztein és szerin proteázok szöveti vizsgálata colon carcinomában	15
3.1.1. Beteganyag	15
3.1.2. Szöveti mintavétel és patológiai értékelés	15
3.1.3. Szöveti homogenizálás	15
3.1.4. Szöveti fehérje meghatározás	16
3.1.5. Proteázok szöveti antigén koncentrációinak meghatározása	16
3.1.6. Statisztikai számítások	16
3.2. A proteázok tumor márkereinek szerepének vizsgálata	17
3.2.1. A proteázok tumor márkereinek vizsgálata colorectalis carcinomában	17
3.2.1.1. Beteganyag	17
3.2.1.2. Perifériás vérminták nyérése	17
3.2.1.3. Proteázok és CEA, CA 19-9 meghatározása a vérmintákból	18
3.2.1.4. Statisztikai számítások	18
3.2.2. A proteázok tumor márkereinek vizsgálata egyéb emésztőszervi daganatokban	18
3.2.2.1. Beteganyag	19
3.2.2.2. Perifériás vérminták nyérése, proteázok meghatározása	19
3.2.2.3. Statisztikai számítások	19
3.3. Az MMP-9 expressziója colorectalis carcinomában	20
3.3.1. Beteganyag	20
3.3.2. MMP-9 immunhisztokémiai expresszió	20
3.3.3. TaqMan RT-PCR	21
3.3.4. Statisztikai számítások	21
3.4. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 expressziója colitis ulcerosában	22
3.4.1. Beteganyag	22
3.4.2. HGFR immunhisztokémiai expresszió	22
3.4.3. IGFR-1 immunhisztokémiai expresszió	23
3.4.4. Gén-expressziós elemzés	23
3.4.5. Taqman RT-PCR	23
3.4.6. Statisztikai számítás	24

3.5. Az MMP-9 és a GST expresszió vizsgálata nyelőcsőben	24
3.5.1. Beteganyag	24
3.5.2. GST immunhisztokémiai expresszió	25
3.5.3. Statisztikai számítás	25
3.6. A sejt proliferáció (PCNA) és p53 expresszió vizsgálata nyelőcsőben	25
3.6.1. Beteganyag	25
3.6.2. Sejt proliferáció (PCNA) immunhisztokémiai expresszió	26
3.6.3. p53 immunhisztokémiai expresszió	26
3.6.4. Statisztikai számítás	27
3.7. Hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló tartós kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára	27
3.7.1. Beteganyag	27
3.7.2. Apoptosis-TUNEL immunhisztokémiai expresszió	27
3.7.3. EGFR immunhisztokémiai expresszió	28
3.7.4. Az immunfestődés intenzitásának értékelése	28
3.7.5. Statisztikai számítás	29
3.8. Tartós PPI kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára	29
3.8.1. Beteganyag	29
3.8.2. Statisztikai számítás	29
3.9. Az SLPI expresszió vizsgálata különböző etiológiájú gastritisekben	30
3.9.1. Beteganyag	30
3.9.2. Az SLPI immunhisztokémiai expressziója	30
3.9.3. Statisztikai számítás	30
4. EREDMÉNYEK	31
4.1. Cisztein és szerin proteázok szöveti vizsgálata colon carcinomában	31
4.1.1. Proteáz szöveti antigén koncentrációk colorectalis daganatos és daganatmentes szövetben	31
4.1.2. Proteáz szöveti antigén koncentrációk az áttétek függvényében	32
4.1.3. Proteáz szöveti koncentrációk a daganatos grading függvényében	32
4.1.4. Proteáz szöveti koncentrációk a Dukes stádium függvényében	33
4.1.5. Szöveti proteázok összefüggése egyéb prognosztikai tényezőkkel	34
4.1.6. Proteázok szöveti koncentrációinak egymás közötti összefüggése	34
4.1.7. A szöveti proteázok prognosztikai szerepe	34
4.1.8. Az uPA-R szöveti koncentrációi colorectalis carcinomában	37
4.1.9. Megbeszélés	39

4.2. A proteolyticus enzimek tumor márkere szerepe	41
4.2.1. Proteázok tumor márkere szerepe colorectalis carcinomában	41
4.2.1.1. Proteáz szérum/plazma koncentrációk colorectalis carcinomában	41
4.2.1.2. Proteáz koncentrációk a Dukes stádium függvényében	42
4.2.1.3. Proteáz koncentrációk diagnosztikus hatékonysága	43
4.2.1.4. Többtenyezős tumor márkere elemzés colorectalis carcinomában	46
4.2.1.5. A szérum/plazma proteázok egymás közötti összefüggése	48
4.2.1.6. A szérum/plazma proteáz koncentrációk prognosztikai szerepe	49
4.2.1.7. Megbeszélés	51
4.2.2. Proteázok tumor márkere szerepe egyéb emésztőszervi daganatokban	53
4.2.2.1. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk emésztőszervi daganatokban	53
4.2.2.2. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk diagnosztikus hatékonysága emésztőszervi daganatokban	54
4.2.2.3. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk emésztőszervi daganatokban az áttétek függvényében	55
4.2.2.4. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk emésztőszervi rákmegelőző állapotokban	56
4.2.2.5. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk korrelációja emésztőszervi daganatokban és rákmegelőző állapotokban	58
4.2.2.6. Megbeszélés	58
4.3. Az MMP-9 expressziója colorectalis carcinomában	61
4.3.1. MMP-9 immunhisztokémiai expressziója az ép nyálkahártya-colorectalis adenoma-dysplasia-carcinoma szekvenciában	61
4.3.2. MMP-9 immunhisztokémiai expressziójának összefüggése a colon carcinoma differenciáltsági fokával és a Dukes stádiumokkal	63
4.3.3. Taqman RT-PCR colorectalis carcinomában	64
4.3.4. Megbeszélés	65
4.4. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 expressziója colitis ulcerosában	67
4.4.1. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója colitis ulcerosában	67
4.4.2. A HGFR és az IGFR-1 immunhisztokémiai expressziója colitis ulcerosában	69
4.4.3. Gén-expressziós elemzés colitis ulcerosában	72
4.4.4. Taqman RT-PCR colitis ulcerosában	72
4.4.5. Az MMP-9, HGFR és IGFR-1 expressziók közötti összefüggések	72
4.4.6. Korrelációs elemzés	72
4.4.7. Megbeszélés	73
4.5. Az MMP-9 és a GST expresszió nyelőcsőben	76
4.5.1. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben	76
4.5.2. A GST immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben	79
4.5.3. Az MMP-9 és a GST expressziók összefüggése nyelőcsőben	81
4.5.4. Megbeszélés	81

4.6. A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió nyelőcsőben	83
4.6.1. A sejt proliferáció (PCNA) változása nyelőcsőben	83
4.6.2. A p53 expresszió változása nyelőcsőben	84
4.6.3. A sejt proliferáció és a p53 expresszió összefüggése nyelőcsőben	87
4.6.4. A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió összefüggése az MMP-9 expresszióval nyelőcsőben	88
4.6.5. Megbeszélés	88
4.7. Hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára	90
4.7.1. A sejt proliferáció változása a gyomornyálkahártyában	90
4.7.2. Az apoptózis változása a gyomornyálkahártyában	91
4.7.3. A p53 expresszió változása a gyomornyálkahártyában	92
4.7.4. Az EGFR expresszió változása a gyomornyálkahártyában	94
4.7.5. Megbeszélés	94
4.8. Tartós PPI kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára	96
4.8.1. Az omeprazol és az esomeprazol kezelés sejtkinetikai hatásai	96
4.8.2. Megbeszélés	100
4.9. Az SLPI expresszió különböző etiológiájú gastritisekben	101
4.9.1. Az SLPI expresszió jellegzetességei gastritisekben	101
4.9.2. Az SLPI expresszió összehasonlítása különböző etiológiájú gastritisekben egy szemikvantitatív pontrendszer alapján	103
4.9.3. Megbeszélés	105
5. KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	106
6. IRODALOM	112
7. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE (a PhD. értekezés óta) (1998-2008)	142
Köszönetnyilvánítás	149

RÖVIDÍTÉSEK

AEC	amino-etil-karbazol
ASA	aszpirin
AUC	görbe alatti terület
BE	Barrett nyelőcső
BSA	borjú szérum albumin
CATB	cathepsin B
CATL	cathepsin L
CA 19-9	carcinoma-asszociált carbohidrát antigén
CEA	carcino-embriónális antigén
CD	Crohn-betegség
95%CL	95% konfidencia határ
COX-2	cyclooxygenase-2 gátló
CRC	colorectalis carcinoma
CU	colitis ulcerosa
dCT	delta CT érték
DAB	diamino-benzidin
ECM	extracelluláris mátrix
EGFR	epithelial growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EV	expressziós érték
FNAB	vékonytű aspirációs biopszia
GED	gastro-epitheliális dysplasia
GERD	gastrooesophagealis refluxbetegség
GST	glutathion S-transferase
GC	gyomorrák
GI	gastrointestinális
HCC	hepatocellularis carcinoma
HGD	magas fokú - high-grade - dysplasia
HGF	hepatocyte growth factor
HGFR	hepatocyte growth factor-receptor
H. pylori	Helicobacter pylori
HR	Hazard ratio

IBD	gyulladásos bélbetegség
IGFR-1	insulin-like growth factor receptor-I
LGD	alacsony fokú - low-grade - dysplasia
LI	jelölési index, labeling index
LSD	least significant difference teszt
mRNS	messenger RNS
MMP	mátrix metalloproteináz
MMP-9	mátrix metalloproteináz-9
NS	nem szignifikáns
NSAID	nem-szteroid gyulladásgátló
NPV	negatív prediktív érték
PC	pancreas carcinoma
PA	plasminogén activator rendszer
PAI	plasminogén activator inhibitor
PAI-1	1-es típusú plasminogén activator inhibitor
PCNA	proliferációs sejtmag antigén; proliferating cell nuclear antigen
PMNL	polymorphonucleáris leukocita
pro-uPA	pro-urokinase-típusú activator
PPI	protonpumpa gátló
PPV	pozitív prediktív érték
r	korrelációs koefficiens
rS	Spearman rank korrelációs koefficiens
ROC	receiver operating characteristics
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
SD	standard deviáció
SEM	standard error of mean
SLPI	secretoros leucocyta protease inhibitor
uPA	urokinase típusú plasminogén activator
uPA-R	urokinase típusú plasminogén activator receptor
TIMP	MMP szöveti inhibitor
TPA	szöveti típusú plasminogén activator

1. BEVEZETÉS, ELŐZMÉNYEK

A fehérjebontó proteolyticus enzimek (proteázok) számos anyagcsere folyamatban játszanak szerepet (pl. véralvadásban, gyulladásban, sebgyógyulásban, fehérje turnoverben) (1).

A proteolyticus enzimek négy csoportja (cisztein-, szerin-, asparticus-, metalloproteázok) az aktív helyen lévő nélkülözhetetlen katalitikus komponensről (aminosavról) kapta a nevét (2) (1. táblázat).

Tulajdonság	Cisztein	Szerin	Asparticus	Metallo/Cink
Aktív hely	Cisztein	Szerin	Aspartát sav	Cink
Optimális pH	7-9	3-7	2-4	5-9
Lokalizáció	Lizozómák	Intra- Extracelluláris	Lizozómák	Intra- Extracelluláris
Példák	Cathepsin B,L,C,H	Elastase Trypsin uPA, TPA	Pepsinogen I, II Cathepsin D, E	Collagenase Gelatinase Stromelysin

Rövidítések: uPA: urokinase típusú plasminogén activator; TPA: szöveti típusú plasminogén activator

1. táblázat. A proteázok osztályozása és jellemzői

A daganat-biológiában a proteolyticus enzimek fontos szerepet játszanak az invázióban és az áttétképzés bonyolult folyamatában. A cisztein proteázok csoportjába tartozó cathepsin B és L (CATB, CATL) az extracelluláris mátrix (ECM) lebontása révén hozzájárulnak az invázióhoz és az áttétképzéshez. A szerin proteázokhoz tartozó plasminogén activátor (PA) rendszernek szerepe van a fehérje-degradációs folyamatokban. A szöveti típusú plasminogén activator (TPA) kulcsenzim a fibronolyticus kaszkádban, míg az urokinase típusú plasminogén activator (uPA) és az urokinase típusú plasminogén activator receptor (uPA-R) az ECM-fehérjék plazmin általi mediált degradációja révén segítik elő a daganatos inváziót. Az aktív uPA a plasminogénnek plasminná történő átalakulását katalizálja, a plasmin pedig számos metalloproteináz proenzim, mint pl. prostromelysin, procollagenase, progelatinase aktivációjára képes. A CATB a pro-urokinase-típusú activator (pro-uPA) is aktiválja.

A PA működését a plasminogén activator inhibitorok (PAI) ellenőrzik, amelyek a szerpin családba tartoznak. Az 1-es típusú plasminogén activator inhibitor (PAI-1) élettani körülmények között bénítja mindkét plasminogén activatort (TPA, uPA). A tumorbiológiában a PAI-1 hatásmechanizmusa nagyon összetett: (i) a PAI-1 a malignusan átalakult szövet specifikus fehérjéjeként fogható fel; (ii) a daganatos szövetet megvédi a környező szövet proteolyticus degradáló hatásától; (iii) a PAI-1 fontos az angiogenesisben, amely alapvető a daganatos terjedésben (3-19).

Az 1997-ben megvédett PhD. értekezésemben a cisztein proteáz CATB, CATL, valamint a szerin proteázokhoz tartozó PA rendszer (uPA, uPA-R) és az inhibitor PAI-1 viselkedését tanulmányoztam gyomorrákban, a gyomor precancerosus laesióiban, valamint pepticus fekélybetegségben. Igazoltuk, hogy a vizsgált proteázok fontosak a gyomorrák inváziójában és progressziójában. A CATB, CATL, uPA, uPA-R és PAI-1 szöveti antigén koncentrációi szignifikánsan nagyobbak a gyomorrák szöveti homogenizátumában a daganatmentes gyomorszövethez képest. Immunhisztokémiai vizsgálatok során kimutattuk, hogy az uPA és PAI-1 a daganatos és a stromális sejtekben egyaránt expresszálódik. A proteázok lehetséges prognosztikus szerepét is vizsgáltuk. Igazoltuk az uPA, PAI-1 és CATB prognosztikai jelentőségét: a nagyobb szöveti antigén koncentrációk szorosabb összefüggést mutattak a túléléssel, mint a klasszikus hisztomorphológiai paraméterek (TNM stádium, differenciáció-grading, vagy a Borrmann osztályozás). Bebizonyítottuk, hogy gyomorrákban a magas uPA-R koncentráció a túlélés független prognosztikai tényezője. Megerősítettük a PA rendszer és a PAI-1 fontos szerepét a gyomor carcinogenesisben, valamint a gyomor carcinoma progressziójában (20, 21).

Igazoltuk, hogy a proteázok a gyomor precancerosus laesióiban is aktiválódnak: a CATB, CATL, uPA és PAI-1 szöveti koncentrációi a daganatos és daganatmentes szövetekre jellemző értékek között mozognak. Bebizonyítottuk, hogy a proteázok szöveti koncentrációja szorosan összefügg a rákmegelőző eltérések súlyosságával (22). Eredményeink jól illeszthetők a Correa féle többtényezős, többlépcsős gyomor carcinogenesis modellbe (23, 24).

Pepticus fekélybetegségben elsők között igazoltuk, hogy a károsodott fibrinolyticus rendszer, a szöveti proteázok, valamint a remodelling és angiogenesis fontos szerepet játszanak a fekély kialakulásában ill. gyógyulásában (25, 26).

Más munkacsoportok a cathepsinek (27-31) és a PA rendszer (32-38) szöveti viselkedését egymástól függetlenül colorectalis carcinomában (CRC) is tanulmányozták. CRC-ben a proteázok esetleges tumor márkere szerepéről kevés adat áll rendelkezésünkre: a CATB, uPA és PAI-1 szérumban ill. plazma koncentrációit csak egymástól függetlenül vizsgálták (39-43).

Mivel a cathepsinek és a PA rendszer szöveti viselkedését korábban egyidejűleg még nem vizsgálták CRC-ben, ill. alig van adat együttes tumor márkere szerepéről, MTA Doktori értekezésemben összefoglalt vizsgálatok egy része erre a kérdéskörre irányult.

A cisztein és szerin proteázok mellett egy másik proteolyticus enzimrendszer, a mátrix metalloproteinázok (MMP) expresszióját is tanulmányoztuk CRC-ben. Az MMP-k cinkfüggő endopeptidázok, amelyek az ECM degradációja révén hozzájárulnak a daganatsejtek lokális inváziójához, a távoli áttétképzéshez, valamint a daganat növekedéséhez nélkülözhetetlen angiogenesishez (44-48). Az MMP-k gelatinase, collagenase, stromelysin és membrán-típusú MMP alcsoportokra oszthatók. A IV-es típusú kollagén a bazális membrán fontos alkotó fehérjéje. A mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) (gelatinase B; IV-es típusú collagenase) különösen fontos a daganatos invázióban és az áttétképzésben. CRC-ben egyéb MMP-k (pl. MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-13) mellett az MMP-9 fokozott expresszióját is igazolták (49-53). Egyes vizsgálatok az MMP-9 lehetséges prognosztikai szerepét is felvetették CRC-ben (54-57). Mivel az MMP-9 viselkedését eddig még nem vizsgálták az ép vastagbél nyálkahártya - adenoma - dysplasia - CRC szekvenciában, az MMP-9 expresszióját a fenti szekvenciában tanulmányoztuk.

Az MMP-k különböző gyulladásos folyamatokban is részt vesznek, míg a szöveti újjáalakítás (remodelling) révén a sebgyógyulásban is szerepet játszanak. Gyulladásos bélbetegségben (IBD) az MMP-k részt vesznek a T-sejt mediált szöveti károsodásban, fontosak a gyulladás során fellépő szöveti destrukció és remodelling folyamataiban (58-62). Fokozott MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 és MMP-13 mRNS expressziót igazoltak IBD-s szövettani mintákban (63-65). Korábban kimutatták, hogy az MMP-9 IBD-ben szerepet játszik a gyulladásban és a remodellingben (47, 66, 67).

Colitis ulcerosa (CU) esetében azonban az MMP-9 viselkedéséről kevés adattal rendelkezünk (58, 63, 68, 69). CU-ban az MMP-9 szöveti expresszióját eddig még

nem vizsgálták a nyálkahártyagyulladás súlyosságának függvényében, ill. az MMP-9 és egyes növekedési faktorok viselkedését nem tanulmányozták egyazon beteganyagban. Ezért egy másik vizsgálatsorozatban az MMP-9 expresszióját a CU gyulladással aktivitásának függvényében tanulmányoztuk, és egyazon beteganyagban összevetettük az MMP-9 expresszió viselkedését a hepatocytá eredetű növekedési faktor receptor (hepatocyte growth factor-receptor, c-met, HGFR) valamint az 1-es típusú inzulinszerű növekedési faktor receptor (insulin-like growth factor receptor-1, IGFR-1) expressziók változásával.

A HGFR proto-onkogén által kódolt hepatocytá eredetű növekedési faktor receptor fehérje, amely tirozin-kináz aktivitással rendelkezik. A HGFR ligandja a hepatocytá eredetű növekedési faktor (hepatocyte growth factor, HGF). A HGF, amelyet eredetileg a hepatocyták hatékony mitogén tényezőjeként írtak le, fontos szerepet játszik a máj regenerációjában. A HGF az emésztőrendszer hámsejtjeiben is megtalálható. A HGF a hámsejtek egyik legerősebb mitogén hatású tényezője. A HGFR-HGF rendszer fontos a bélrendszer homeosztázisában, elősegíti a sebgyógyulást, valamint a remodelling folyamatát (70-77).

Az IGFR-1 az inzulin receptor tirozin-kináz család tagja, nagy jelentősége van a transzformációs folyamatokban. Az IGFR-1 legfontosabb ligandja az 1-es típusú inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor-1, IGF-1), amelynek általános metabolikus hatása van, fokozza a sejt proliferációt, anti-apoptotikus hatása révén pedig elősegíti a sejtek túlélését és növekedését. Az IGFR-1 szerepet játszik az ECM remodellingben, az immunmodulációban, a regeneratív folyamatokban, valamint a bélnyálkahártya gyulladásában (78-83). A HGFR és az IGFR-1 viselkedésével kapcsolatban elsősorban sejtvonalakon és kísérleti állatokban végzett vizsgálatokból származó experimentális adatokkal rendelkezünk. A HGFR és az IGFR-1 humán vonatkozásairól IBD-ben viszonylag kevés adatot közöltek (84-90).

Számos MMP (MMP-2; MMP-3; MMP-7; MMP-12; MMP-13) expresszióját igazolták nyelőcső laphámrák és adenocarcinoma esetében. A nyelőcsőrák terjedése során az MMP-k fontosak az ECM degradációjában, a daganatos invázióban és terjedésben (91-94). Nyelőcső laphámrák esetében az MMP-9 fokozott expresszióját is igazolták, de nyelőcső adenocarcinomában és rákmegelőző állapotaiban alig ismert az MMP-9 szerepe (95-98).

A glutathion S-transferase-nak (GST) a nyelőső carcinogenesisben betöltött szerepéről szintén keveset tudunk. A GST számos carcinogén anyag detoxifikálása révén fontos lehet a daganat megelőzésében. Az alacsony GST enzimszint növeli a nyelőső daganat kialakulásának kockázatát. Csökkent GST enzimaktivitást mutattak ki Barrett-nyelősőben (Barrett esophagus, BE), és fordított összefüggést igazoltak a GST enzimaktivitás és az emésztőszervi daganatok incidenciája között (99-102).

Az MMP-9 és a GST viselkedését egyazon beteganyagban eddig még nem vizsgálták, szerepük a nyelőső carcinogenesis korai stádiumaiban alig ismert. Ezért vizsgálataink során a nyelőső eltérések széles skálájában (ép nyelőső - BE - dysplasia - nyelőső adenocarcinoma szekvenciában) az MMP-9 és a GST expresszió változását egyazon beteganyagban tanulmányoztuk.

Jóllehet a tumor szuppresszor hatású p53 mutációját és fokozott expresszáldását, valamint fokozott sejt proliferációt igazoltak BE és nyelőső adenocarcinoma esetében, a fenti folyamatok jelentősége a nyelőső carcinogenesis korai stádiumaiban nem tisztázott (103-111). A sejt proliferációt és a p53 mutációt az ép nyelősőtől a nyelőső adenocarcinomáig terjedő szekvenciában egyidejűleg eddig még nem tanulmányozták. Ezért tanulmányaink során a sejt proliferáció (proliferációs sejtmag antigén - proliferating cell nuclear antigen, PCNA) és a tumor szuppresszor p53 expresszió egyidejű viselkedését vizsgáltuk a teljes nyelőső szekvenciában.

Mivel keveset tudunk a hagyományos nem szelektív nem-szteroid gyulladásgátló (NSAID) és a szelektív cyclooxygenase-2 (COX-2) gátló kezeléseknek a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára kifejtett hatásáról, egy másik vizsgálatsorozatban a gyomornyálkahártya sejtkinetikai változásait (hámsejt proliferáció; apoptosis; epitheliális növekedési faktor receptor - epithelial growth factor receptor /EGFR/ expresszió; p53 expresszió) hagyományos NSAID, szelektív COX-2 gátló kezelés során, valamint protonpumpa gátló (PPI) védelemben tanulmányoztuk.

Egy másik tanulmányban a tartós PPI kezelés gyomornyálkahártya sejtkinetikájára kifejtett hatását vizsgáltuk.

A secretoros leucocya protease inhibitor (SLPI) egy többfunkciós fehérje, amely számos szerin proteáz gátlása mellett antibakteriális, antivirális, antifungicid, gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik; szerepet játszik továbbá a sejt proliferáció szabályozásában és elősegíti a sebgyógyulást. Korábban *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-asszociált gastritisben csökkent antralis SLPI koncentrációt igazoltak, de nem egyértelmű, hogy a csökkent expresszió csak a *H. pylori* fertőzéssel függ össze, vagy pedig a nyálkahártyagyulladás általános velejárója (116-121). E kérdés megválaszolására vizsgálataink során az SLPI expressziót *H. pylori*-asszociált gastritis mellett más etiológiájú gastritisekben is tanulmányoztuk.

Az MTA Doktori értekezés egy évtizedes tudományos munka összefoglalója, amely szerves folytatása Ph.D. értekezésemnek. A vizsgálatokat részben a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájának Gasztroenterológiai-Endoszkópos és Sejtanalitikai Laboratóriumaiban, részben pedig nemzetközi együttműködés keretében a padovai Egyetem Gasztroenterológiai Tanszékén (Olaszország), valamint a magdeburgi Egyetem Gasztroenterológiai Tanszékén (Németország) végeztük.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori értekezésemben a bevezetésben felvetett kérdéskörök szerint tárgyalom a célkitűzéseket.

1. A cisztein proteázok (CATB, CATL), a PA rendszer (uPA, TPA, uPA-R) és az inhibitor PAI-1 egyidejű viselkedésének tanulmányozása egyazon CRC beteganyagban daganatos és daganatmentes szövetben; az eredmények értékelése a klasszikus prognosztikai paraméterek függvényében.

2. A proteolyticus enzimek lehetséges tumor márkere szerepének tanulmányozása CRC-ben, valamint egyéb emésztőszervi daganatokban.

3. Az MMP-9 viselkedésének vizsgálata CRC-ben, colorectalis adenomában.

4. Az MMP-9 valamint a HGFR és az IGFR-1 egyidejű viselkedésének tanulmányozása CU-ban.

5. Az MMP-9 és a GST viselkedésének vizsgálata az ép nyelőcső - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában.

6. A sejt proliferáció (PCNA) és a tumor szuppresszor p53 vizsgálata az ép nyelőcső - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában.

7. A sejtkinetikai paraméterek (hámsejt proliferáció, apoptózis, EGFR, p53 expresszió) vizsgálata a gyomornyálkahártyában hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló szedés mellett, ill. PPI védelemben.

8. A sejtkinetikai paraméterek (hámsejt proliferáció, apoptózis, EGFR, p53 expresszió) tanulmányozása a gyomornyálkahártyában tartós PPI kezelés során.

9. Az SLPI expresszió immunhisztokémiai vizsgálata *H. pylori*-asszociált, NSAID-asszociált, autoimmun, valamint lymphocitás gastritisekben.

3. BETEGANYAG, MÓDSZEREK

3.1. *Cisztein és szerin proteázok szöveti vizsgálata CRC-ben*

3.1.1. Beteganyag

Az egyik vizsgálatsorozatban, amelyben a CATB, CATL, uPA, TPA és PAI-1 szöveti antigén koncentrációit tanulmányoztuk, 60 CRC beteg vett részt, akiknél colorectalis sebészeti resectio történt (36 férfi, 24 nő, átlagéletkor 63.8 év, 27-85 év között).

Az UPA-R szöveti antigén koncentrációit a PA/inhibitor rendszerrel együtt (uPA, TPA és PAI-1) egy másik beteganyagban, 35 CRC betegben vizsgáltuk (21 férfi, 14 nő, átlagéletkor 64 év, 46-85 év között).

3.1.2. Szöveti mintavétel és patológiai értékelés

A szöveti antigén koncentrációkat egyazon betegből colorectalis sebészeti műtét során nyert daganatos és a daganat makroszkópos szélétől legalább 10 cm-es távolságból származó daganatmentes szövetben tanulmányoztuk. A zsír- és izomszövet eltávolítását követően, a szövetmintákat a mérésekig -70°C -on tároltuk. A daganatos szövetet a fő hisztomorphológiai paraméterek függvényében értékeltük. A kórbonctani staging során az alábbi paramétereket vizsgáltuk: a nyirokcsomó és/vagy máj áttétek jelenléte; a daganatok differenciáltsági foka (grading) (jól differenciált-G1; közepesen differenciált-G2; rosszul differenciált-G3), valamint a vascularis invasio, a nyáktermelés és a daganatos necrosis jelenléte vagy hiánya. A daganatokat lokalizáció szerint is osztályoztuk (jobb colonfélben elhelyezkedő daganatok -coecumtól a flexura lienalisig; bal colonfél daganatai -flexura lienalistól a rectumig). A daganat staging a Dukes klasszifikáció (122) és a Turnbull féle módosítás (123) alapján történt.

3.1.3. Szöveti homogenizálás

A szöveti homogenizálást Teflon homogenizátorban 50-100 mg szövetből Tris Tween puffer felhasználásával (0.1M, 0.1% Tween 80, pH 7.5) végeztük (20). Tíz perces, 4°C -on történő ($\times 10.000$ g) centrifugálás után a szupernatánsokat -70°C -on tároltuk a meghatározásokig.

3.1.4. Szöveti fehérje meghatározás

A szöveti homogenizátumok fehérje koncentrációinak meghatározását Bradford módszere alapján végeztük (Bio-Rad, München, Németország) (124).

3.1.5. Proteázok szöveti antigén koncentrációinak meghatározása

A proteázok szöveti antigén koncentrációit ELISA módszerrel mértük (20, 21, 22, 26).

A **cathepsin immunoassay** egy szolid fázisú ELISA módszer (BioAss, Diesen, Németország). A CATB és CATL abszolút koncentrációit hatpontos standard görbe révén (0-250 ng/ml) határoztuk meg. A legkisebb detektálható koncentráció 1 ng/ml volt.

Az **uPA antigén meghatározás** TintElize uPA-ELISA (Biopool, Umea, Svédország) kittel történt. Hatpontos standard görbét alkalmaztunk (0-4 ng/ml). Az uPA legkisebb detektálható koncentrációja 0.1 ng/ml volt.

A **PAI-1 antigén koncentráció** meghatározása Asserachrom PAI-1 ELISA-val történt (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Franciaország), hétpontos standard görbe segítségével (0-20 ng/ml), 0.5 ng/ml legkisebb detektálható koncentrációval.

A **TPA antigén koncentrációt** TintElize TPA-ELISA (Biopool, Umea, Svédország) segítségével határoztuk meg, négyponos standard görbe segítségével (0-30 ng/ml), 1.5 ng/ml legkisebb detektálható koncentrációval.

Az **uPA-R antigén koncentráció** meghatározására IMUBIND Total uPAR ELISA kittel alkalmaztunk (American Diagnostica, Greenwich, CT), 6-pontos standard görbe segítségével (0-3 ng/ml), 0.1 ng/ml legkisebb detektálható koncentrációval.

A szöveti antigén koncentrációkat ng antigén/mg protein értékben adtuk meg.

3.1.6. Statisztikai számítások

A statisztikai számítások során Student t-, Mann-Whitney U-, ANOVA one-way tesztek, valamint Kruskal-Wallis variancia analízist alkalmaztunk. A proteázok egymás közötti korrelációit standard lineáris regressziós analízis segítségével vizsgáltuk. Az optimális határértékek (cut-off értékek) meghatározásához ROC (receiver operating characteristics) görbéket és Youden J tesztet alkalmaztunk (Youden J test for overall accuracy). A túléléshez a Mantel-Haenszel túlélési görbéket használtuk. A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.2. A proteázok tumor márkerek szerepének vizsgálata

3.2.1. A proteázok tumor márkerek szerepének vizsgálata CRC-ben

CRC-ben a proteázok tumor márkerek szerepének tanulmányozásakor a szérumban CATB, CATL és a plazmában uPA, PAI-1 antigén koncentrációit a diagnózis felállítása pillanatában összehasonlítottuk a gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott tumor márkerek (carcino-embriónális antigén - CEA, és carcinoma-asszociált carbohidrát antigén - CA 19-9) szérumban koncentrációival. Az eredményeket összevetettük a főbb klinikopatológiai paraméterekkel és a CRC prognózisával.

3.2.1.1. Beteganyag

A vizsgálatban az alábbi csoportokat tanulmányoztuk:

- 56 CRC beteg (29 férfi, 27 nő; átlagéletkor 65.4 év, 39-86 év között);
- 35 daganatmentes kontroll (12 férfi, 23 nő, átlagéletkor 46.3 év, 24-85 év között);
- 25 CU (colonoscopiával és szövettannal igazolt, dysplasia-mentes betegek) (11 férfi, 14 nő, átlagéletkor 31.7 év, 22-48 év);
- 26 colorectalis adenomás beteg (az endoszkópos polypectomiát követően a szövettani feldolgozás alapján: n=16 tubuláris adenoma alacsony fokú dysplasiával, low grade dysplasia-LGD; n=10 tubulovillosus adenoma magas fokú dysplasiával, high grade dysplasia-HGD) (17 férfi, 9 nő, átlagéletkor 57.8 év, 47-72 év között).

3.2.1.2. Perifériás vérminták nyérése

A szérumban ill. plazmában mintákat a diagnózis felállításakor nyertük. A vérvétel éhgyomorra, 12 órás éhezést követően reggel 8:00 és 10:00 óra között történt, hogy elkerüljük a fibrinolyticus rendszer esetleges cirkadián ritmusváltozását (125). Minimális vénás leszorítást követően a könyökvenából citrátos csövekbe történt a vérvétel, hogy megelőzzük a thrombocyták aktivációt és a thrombocyták kontaminációt. A plazmát 4°C-on 15 percig történő 3000xg centrifugálással szeparáltuk. A proteázok meghatározásáig a mintákat a mérésekig -70°C-on tároltuk.

3.2.1.3. Proteázok és CEA, CA 19-9 meghatározása a vérmintákból

A proteázok antigén koncentrációinak meghatározását az előbbieken már részleteztük. A szérum ill. plazma proteáz antigén koncentrációkat ng/ml értékben adtuk meg.

A szérum CEA (carcinoembryonic antigen electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA", Cobas®, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország; cut-off érték: 4.0 ng/ml) és a szérum CA 19-9 (carbohydrate electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA", Cobas®, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország; cut-off érték: 37.0 ng/ml) koncentrációkat a klinikai gyakorlatban alkalmazott kiték segítségével határoztuk meg. A CEA és a CA 19-9 koncentrációit ng/ml értékben fejeztük ki.

3.2.1.4. Statisztikai számítások

A statisztikai számítások során Kolmogorov-Smirnov, Student t-, Mann-Whitney U-, ANOVA one-way tesztek és Kruskal-Wallis variancia analízist alkalmaztunk. A proteázok ill. a CEA, CA 19-9 közötti korrelációkat a Spearman rank-korrelációs teszt segítségével vizsgáltuk. A proteázok optimális cut-off értékeinek meghatározásához ROC görbéket és Youden J tesztet alkalmaztunk. A diagnosztikus hatékonyság vizsgálata során a specificitás, szenzitivitás, pozitív prediktív érték (PPV), negatív prediktív érték (NPV) és diagnosztikus pontosság (diagnostic accuracy) meghatározása mellett az egyes márkereket Fisher-teszt segítségével is összevetettük. A túlélési vizsgálatokhoz a Kaplan-Meier módszer mellett uni- és multivariáns elemzést is végeztünk. A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.2.2. A proteázok tumor márkereinek szerepének vizsgálata egyéb emésztőszervi daganatokban

Egy másik vizsgálatsorozatban a CATB és az uPA tumor márkere viselkedését CRC mellett egyéb gastrointestinalis (GI) daganatokban is tanulmányoztuk (gyomorrák-GC, hepatocellularis carcinoma-HCC, és pancreas carcinoma-PC).

3.2.2.1. Beteganyag

Az alábbi GI daganatos csoportokat vizsgáltuk:

- 72 CRC beteg (39 férfi és 33 nő; átlagéletkor 66.2 év, 39-86 év között);
- 30 GC beteg (a diagnózist gastroscopia és/vagy sebész resectio során szövettannal igazoltuk) (21 férfi és 9 nő, átlagéletkor 69.2 év, 48-84 év között);
- 28 HCC beteg (a diagnózist képalkotó eljárásokkal, vékonytű aspirációs biopsziával-FNAB és/vagy sebészi resectio során szövettannal igazoltuk) (17 férfi és 11 nő, átlagéletkor 66.8 év, 48-82 év között);
- 15 PC beteg (a diagnózist képalkotó eljárásokkal és/vagy sebészi resectio során szövettannal igazoltuk) (11 férfi és 4 nő, átlagéletkor 71.2 év, 59-84 év között);

További vizsgált csoportok:

- 25 chronicus atrophias gastritis betege gastro-epitheliális dysplasiával (GED) (16 férfi és 9 nő, átlagéletkor 59.1 év, 45-73 év között); a GED minden esetben multifokális és alacsony fokú volt (LGD), amelyet Cassaro és *mtsai* leírásának megfelelően endoszkópos biopsziás mintákból határoztunk meg (126);
- 30 colorectalis adenomás beteg (az endoszkópos polypectomiát követően a szövettani feldolgozás alapján: n=16 tubuláris adenoma és LGD; n=14 tubulovillosus adenoma és HGD) (20 férfi, 10 nő, átlagéletkor 58.2 év, 47-72 év között);
- 44 daganatmentes kontroll egyén (negatív gastroscopos és colonoscopos leletekkel) (17 férfi és 27 nő, átlagéletkor 45.4 év, 24-85 év között).

3.2.2.2. Perifériás vérminták nyérése, proteázok meghatározása

A szérum ill. plazma mintákat a diagnózisok felállításakor, a műtéti beavatkozásokat megelőzően nyertük. A vérvétel a fentiekben részletezett módon történt. A proteázok meghatározásáig a mintákat a mérésekig -70°C -on tároltuk. A proteázok antigén koncentrációinak meghatározását az előbbieken már részleteztük. A szérum ill. plazma proteáz antigén koncentrációkat ng/ml értékben adtuk meg.

3.2.2.3. Statisztikai számítások

A statisztikai elemzéshez Student t-, Mann-Whitney U-, ANOVA one-way tesztek és Kruskal-Wallis variancia analízist alkalmaztunk. A CATB és uPA közötti korrelációt standard lineáris regresszióval vizsgáltuk. Az optimális cut-off értékek meghatározására ROC görbéket és Youden J tesztet alkalmaztunk. Meghatároztuk a szenzitivitást, specificitást, PPV-t, NPV-t és a diagnosztikus pontosságot.

3.3. Az MMP-9 expressziója CRC-ben

Az MMP-9 immunhisztokémiai és mRNS expresszióját CRC-ben daganatos és daganatmentes szövetben, valamint colorectalis adenomákban vizsgáltuk.

3.3.1. Beteganyag

Az alábbi csoportokat tanulmányoztuk:

- 31 CRC beteg (daganatos és ép biopsziás szövetmintákat nyertünk a rutin colonoscopia során; 11 férfi és 20 nő, átlagéletkor 61 év, 47-74 év között);
- 30 colorectalis adenomás beteg (az endoszkópos polypectomiát követően a szövettani feldolgozás alapján: n=11 tubuláris adenoma dysplasia nélkül; n=10 tubulovillosus adenoma és LGD; n=9 tubulovillosus adenoma és HGD) (13 férfi és 17 nő, átlagéletkor 58.2 év, 43-68 év között).

Az mRNS meghatározás során a TaqMan reverz transzkripció polimeráz láncreakcióhoz (TaqMan real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) független mintákat használtunk: n=10 CRC; n=5 egészséges szövetminta; n=13 colorectalis adenoma (közülük dysplasia-mentes: n=6; adenoma és HGD: n=7).

3.3.2. MMP-9 immunhisztokémiai expresszió

Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziót paraffinba ágyazott szöveti metszeteken CRC-ben (n=31) (daganatos és normális szövetben) valamint colorectalis adenomában (n=30) monoclonalis anti-humán MMP-9 antitest segítségével (Clone, 36020.111, R&D Systems) vizsgáltuk. A 4µm vastagságú metszeteket xylénben deparaffináltuk és rehidráltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Az aspecifikus kötődés megelőzéséhez a mintákat szobahőmérsékleten, 10 percig 3%-os borjú szérum albumin (BSA) oldattal kezeltük. Ezt követően hígítási sorozat alapján optimálisan hígított anti-MMP-9 antitesttel (10µl antitest és 190µl PBS, munkakonzentráció: 10 mikrogramm/ml) (mintánként 50µl-t vittünk fel), majd a mintákat 60 percig 37C°-os nedves kamrában inkubáltuk. Háromszori alapos PBS-ben való mosást követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO) rendszerrel hajtottuk végre. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A szöveti metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Az immunfestődés intenzitásának értékelése szemikvantitatív módon történt (67, 127).

Az MMP-9 festődés intenzitását a festődés hiánya (0) ill. enyhe (1), közepes (2) és kifejezett festődés (3) alapján 0 és 3 között értékeltük. A kiértékelést két független vizsgáló végezte a klinikai adatok ismerete nélkül. A két mérési eredmény között kevesebb, mint 5% eltérés adódott. Az expresszió intenzitását összevetettük a Dukes osztályozással és a CRC differenciáltsági fokával (grading).

3.3.3. TaqMan RT-PCR

A vizsgált minták mRNS meghatározásához MMP-9 (TaqMan probe ID: Hs00957562_m1) TaqMan RT-PCR-t alkalmaztunk Applied Biosystems Mikrofoliadék Kártyarendszer (Applied Biosystems Micro Fluidic Card System) felhasználásával. A meghatározásokat ABI PRISM® 7900HT szekvencia detektáló rendszerrel végeztük a gyártó eredeti leírásának megfelelően (ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System; <http://www.appliedbiosystems.com>, CA, USA).

3.3.4. Statisztikai számítások

A statisztikai elemzés ANOVA one-way (variancia analízis) és LSD teszt (least significant difference) segítségével történt (Statistica for Windows 4.3 program). A Taqman RT-PCR elemzés során SDS 2.2 software elemzési programot használtunk. A delta CT értékeket (dCT) (amely a riboszomális 18S expresszióhoz képest a normalizált expressziót jelenti) a vizsgált szövettani csoportok szerint elemeztük. A csoportok közötti expressziós értékek összehasonlítására Student t-tesztet végeztünk. A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.4. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 expressziója colitis ulcerosában

Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 egyidejű viselkedését CU-ban tanulmányoztuk és összevetettük a nyálkahártya gyulladás súlyosságával.

3.4.1. Beteganyag

A colonoscopia során 36 CU betegből a makroszkóposan leginkább gyulladt területről vettünk mintákat. A vizsgálatban 21 férfi és 15 nő vett részt (átlagéletkor 39 év, 23-59 év között). A kontroll csoportot 5 férfi és 5 nő alkotta (átlagéletkor 42 év, 22-57 év között), akiknél irritábilis bél szindróma tünetei miatt végzett colonoscopia során makroszkópos eltérést nem találtunk, ill. a biopsziás minták feldolgozása során nem igazolódott kóros szövettani eltérés.

Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 immunhisztokémiai expressziókat a nem megfelelő metszetek kiiktatását követően, a CU biopsziás mintákból 11 enyhe, 11 közepes és 12 súlyos gyulladáshoz tartozó minta, valamint 10 egészséges-kontroll metszet esetében vizsgáltuk.

A gén-expressziós elemzéshez független mintákként 11 egészséges és 12 súlyosan aktív CU betegből nyertünk colonoscopos szövettani anyagot, amelyeket speciális reagensben (RNALater Reagent, Qiagen Inc., US) -70C°-os hőmérsékleten tároltunk. A teljes RNS kinyerését követően történt a gén-expressziós elemzés.

Az **MMP-9** immunhisztokémiai expressziót a fentiekben részletezett módszerrel vizsgáltuk (3.3.2. alfejezet).

3.4.2. HGFR immunhisztokémiai expresszió

Az expresszió vizsgálata paraffinba ágyazott szöveti metszeteken történt. A 4µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltárást 20 percig szobahőmérsékleten, nukleázmentes proteináz K-val (Roche) történő emésztéssel végeztük. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Az aspecifikus kötődés megelőzéséhez szobahőmérsékleten, 10 percig 3%-os BSA oldattal kezeltük a mintákat. Ezt követően hígítási sorozat alapján optimálisan hígított anti-Met kultúra szupernatáns antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc.; Clone: C-12; 1µl antitest és 99µl PBS) 60 percig 37C°-os nedves kamrában inkubáltuk a mintákat. Háromszori alapos PBS-ben történő mosást követően

a jelkonverziót LSAB2 (DAKO) rendszerrel hajtottuk végre. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. Az immunfestődés mértékét szemikvantatív módszerrel határoztuk meg.

3.4.3. IGFR-1 immunhisztokémiai expresszió

Az immunhisztokémiai expressziót paraffinba ágyazott metszeteken tanulmányoztuk. A 4 μ m vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltáráshoz a mintákat pH 8.0-as 1mM-os EDTA oldatba helyeztük, majd 3 percig 750 W, 3 percig pedig 370 W teljesítménnyel mikrohullámú sütőben forraltuk. Forralást követően a mintákat kb. 30 percig szobahőmérsékleten hűtöttük, majd PBS-be helyeztük. Az endogén peroxidáz aktivitást 30 percig tartó, szobahőmérsékleten zajló 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Az aspecifikus kötődés megelőzéséhez szobahőmérsékleten, 10 percig 3%-os BSA oldattal kezeltük a mintákat. Ezt követően hígítási sorozat alapján optimálisan hígított anti-IGF1R monoclonális antitesttel (1 μ l antitest és 49 μ l PBS; Clone: 24-31, MAB 1120, Chemicon International) 60 percig 37C^o-os nedves kamrában inkubáltuk a mintákat. Háromszori alapos PBS-ben történő mosást követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO) rendszerrel végeztük, majd hematoxilines magfestés történt. Az immunfestődés mértékét szemikvantatív módszerrel határoztuk meg.

3.4.4. Gén-expressziós elemzés

A gén-expressziós microarray elemzés a korábban leírt módszer szerint történt (128). Röviden, a teljes RNS kinyerését RNeasy Mini Kit (Qiagen, US) segítségével végeztük. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét agaróz-gél elektroforézissel határoztuk meg. A további elemzéshez Affymetrix módszert alkalmaztunk (GeneChip cDNA synthesis reagent és Enzo BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit segítségével). A fluoreszcens jelzést GeneChip Scanner 3000 mérőeszközzel végeztük.

3.4.5. Taqman RT-PCR

A vizsgált minták mRNS meghatározásához MMP-9 (TaqMan probe ID: Hs00957562_m1), HGFR (TaqMan probe ID: Hs00179845_m1) és IGFR-1 (TaqMan probe ID: Hs00181385_m1) TaqMan real-time PCR-t alkalmaztunk Applied

Biosystems Mikrofluidic Kártyarendszer (Applied Biosystems Micro Fluidic Card System) felhasználásával. A meghatározásokat ABI PRISM® 7900HT szekvencia detektáló rendszerrel végeztük a gyártó eredeti leírásának megfelelően (ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System; <http://www.appliedbiosystems.com>, CA, USA). A teljes ciklus szám 45-nek felelt meg.

3.4.6. Statisztikai számítás

A statisztikai elemzés ANOVA one-way (variancia analízis) és LSD teszt segítségével történt (Statistica for Windows 4.3 program). A Taqman RT-PCR elemzés során SDS 2.2 software elemzési programot használtuk. A dCT értékeket (amely a ribozomális 18S expresszióhoz képest a normalizált expressziót jelenti) a vizsgált szövettani csoportok szerint elemeztük. A csoportok közötti expressziós értékek összehasonlítására Student t-tesztet végeztünk. A korrelációs elemzés során az RT-PCR expressziós értékeket (teljes ciklus szám - dCT érték) és az immunhisztokémiai expressziós értékeket a normális és a súlyos CU mintákban hasonlítottuk össze. Az RT-PCR értékeket a crypta területén észlelt hám-expresszióval és a lamina propria szintjén észlelt expresszióval egyaránt összevetettük. A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.5. Az MMP-9 és a GST expresszió vizsgálata nyelőcsőben

Az MMP-9 és a GST expresszióját az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában tanulmányoztuk.

3.5.1. Beteganyag

Az MMP-9 és a GST expressziót immunhisztokémiai módszerrel 51 paraffinba ágyazott nyelőcsőből származó szöveti metszetben tanulmányoztuk (33 férfi és 18 nő, átlagéletkor 64 év, 22-83 év között), az alábbi csoportosításban: reflux oesophagitis (n=7); BE (n=14); BE + oesophagitis (n=8); BE + dysplasia (n=7); nyelőcső adenocarcinoma (n=8); valamint felső endoszkópos és szövettani eltérések nélküli kontroll csoport (n=7).

Az **MMP-9** immunhisztokémiai expressziót a fentiekben részletezett módszerrel vizsgáltuk (3.3.2. alfejezet).

3.5.2. GST immunhisztokémiai expresszió

A 4 µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az endogén peroxidáz aktivitást (30 perc, 3%-os hidrogén peroxid) és az aspecifikus blokkolást (1% BSA-PBS, 10 perc) követően a metszeteket 1:150 arányban hígított GSTP1 antitesttel (DAKO, A3600) 37C°-on 60 percig inkubáltuk. PBS öblítést követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO, LSAB2 System, AEC) rendszerrel végeztük. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. Az immunfestődés mértékét szemikvantatív módszerrel határoztuk meg.

3.5.3. Statisztikai számítás

Az adatok statisztikai elemzését ANOVA one-way (variancia analízis), LSD teszt és korrelációs analízis segítségével végeztük (Statistica for Windows, 4.3 verzió programcsomag). A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.6. A sejt proliferáció (PCNA) és p53 expresszió vizsgálata nyelőcsőben

A sejt proliferáció (PCNA) és p53 expresszióját az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában tanulmányoztuk.

3.6.1. Beteganyag

A PCNA és a p53 expressziót immunhisztokémiai módszerrel 51 paraffinba ágyazott nyelőcsőből származó szöveti metszetben tanulmányoztuk (33 férfi és 18 nő, átlagéletkor 64 év, 22-83 év között), az alábbi csoportosításban: reflux oesophagitis (n=7); BE (n=14); BE + oesophagitis (n=8); BE + dysplasia (n=7); nyelőcső adenocarcinoma (n=8), valamint szövettani eltérések nélküli kontroll csoport (n=7).

3.6.2. Sejt proliferáció (PCNA) immunhisztokémiai expresszió

A PCNA expresszió meghatározása a korábban leírtak szerint történt (129). A 4µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltáráshoz a mintákat pH 6.0-os citrát pufferbe helyeztük, majd 3 percig 750 W, újabb 10 percig pedig 370 W teljesítménnyel mikrohullámú sütőben forraltuk. Forralást követően a mintákat kb. 30 percig szobahőmérsékleten hűtöttük, majd PBS-be helyeztük. Az endogén peroxidáz aktivitást 30 percig tartó, szobahőmérsékleten zajló 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Háromszori alapos PBS öblítést követően a mintákat használatra kész, gyárilag optimálisan hígított, aspecifikus blokkoló anyaggal ellátott anti-PCNA antitesttel (Clone: PC-10, DAKO) kezeltük, és szobahőmérsékletű nedves kamrában 15 percig inkubáltuk. Alapos PBS mosást követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO: K0672) rendszerrel hajtottuk végre. A mintákat 10 percig biotinilált kapcsoló antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten. PBS-ben való kétszeri öblítés után streptavidin-HRP oldatot vittünk fel a mintákra és 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Egy utolsó PBS-ben való mosás után a mintákat 10 percig, szobahőmérsékletű sötétített nedves kamrában AEC kromogén szubsztráttal inkubáltuk. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A szöveti metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Az immunfestődés intenzitásának értékelése szemikvantitatív módon történt.

3.6.3. p53 immunhisztokémiai expresszió

A p53 expresszió meghatározása a korábban leírtak szerint történt (129). A 4µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltáráshoz a mintákat pH 6.0-os citrát pufferbe helyeztük, majd 15 percig 500 W teljesítménnyel mikrohullámú sütőben forraltuk. Forralást követően a mintákat 20 percig PBS-be helyezve hűtöttük. Az endogén peroxidáz aktivitást 30 percig tartó, szobahőmérsékleten zajló 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Háromszori alapos PBS öblítést követően a mintákat gyárilag optimálisan hígított anti-p53 antitesttel (Clone: DO-7, DAKO) kezeltük, és 37C°-on nedves kamrában 30 percig inkubáltuk. Alapos PBS mosást követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO) rendszerrel hajtottuk végre. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A szöveti metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Az immunfestődés intenzitásának értékelése szemikvantitatív módon történt.

3.6.4. Statisztikai számítás

Az adatok statisztikai elemzése ANOVA one-way (variancia analízis), LSD teszt és korrelációs elemzés segítségével történt (Statistica for Windows, 4.3 verzió programcsomag). A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.7. Hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló tartós kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

3.7.1. Beteganyag

A tartós (hat hónapos) hagyományos NSAID (n=10, átlagéletkor 53 év, 41-65 év között) és szelektív COX-2 gátló kezelésben (n=10, átlagéletkor 52 év, 39-65 év között) részesülő rheumatoid arthritises valamint osteoarthrosisos betegekben, ill. NSAID szert nem szedő, dyspepsiás kontroll egyéneknél (n=10, átlagéletkor 52 év, 39-65 év között) az endoszkópos vizsgálat során a gyomor antrum nyálkahártyájából biopsziás mintát nyertünk a PPI kezelés kezdete előtt, ill. a hat hónapos PPI kezelést követően.

A **PCNA** és a **p53** immunhisztokémiai expresszióját a fentiekben részletezett módszerrel vizsgáltuk (3.6.2. és 3.6.3. alfejezetek).

3.7.2. Apoptosis-TUNEL immunhisztokémiai expresszió

A 4µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltáráshoz a mintákat pH 6.0-os citrát pufferbe helyeztük, majd 5 percig 750 W teljesítménnyel mikrohullámú sütőben forraltuk. Forralást követően a mintákat 20 percig PBS-be helyezve hűtöttük. Az antigén-feltárást 20 percig szobahőmérsékleten, nukleázmentes proteináz K-val (Roche) történő emésztéssel végeztük. Kétszeri alapos PBS öblítést követően a mintákat 30µl TUNEL hígító oldattal és 50µl TUNEL reakció keverékkel kezeltük (5µl Tdt enzim oldat és 45µl dUTP oldat, Roche). A mintákat sötét nedves kamrában 37C°-on 120 percig inkubáltuk. Háromszoros PBS mosást követően az endogén peroxidáz aktivitást 30 percig szobahőmérsékleten sötét nedves kamrában 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Kétszeri alapos PBS-ben történő mosást követően a jelkonverziót nem-specifikus módon, 10 percig 1%-os BSA-PBS oldattal szobahőmérsékleten, sötét nedves kamrában végeztük. A maradék BSA pipettával történt eltávolítását követően a mintákat 50µl peroxidázzal jelölt

kapcsoló antitesttel (Converter-POD antibody, Roche) borítottuk be, majd 60 percig sötét nedves kamrában 37C°-on inkubáltuk. Háromszori PBS mosást követően a mintákat 50µl diamino-benzidin (DAB) eleggyel kezeltük (5µl DAB szubsztrát és 45µl peroxid puffer, Roche). A jelkonverziót fénymikroszkóppal ellenőriztük. A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines magfestést alkalmaztunk.

3.7.3. EGFR immunhisztokémiai expresszió

A 4µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltárást 20 percig szobahőmérsékleten, nukleázmentes proteináz K-val (Roche) történő emésztéssel végeztük. Kétszeri alapos PBS-ben való mosást követően az endogén peroxidáz aktivitást 30 perces szobahőmérsékleten történő 3%-os hidrogén-peroxidos kezeléssel gátoltuk. Háromszori alapos PBS-ben történő mosást követően a jelkonverziót nem-specifikus módon, 10 percig 1%-os BSA-PBS oldattal szobahőmérsékleten végeztük. Ezt követően a mintákat hígított EGFR antitesttel kezeltük (1µl EGFR antitest és 40µl PBS; Clone: H-11, DAKO), és 37C°-on nedves kamrában 60 percig inkubáltuk. Háromszori alapos PBS mosást követően a jelkonverziót LSAB2 (DAKO) rendszerrel végeztük, ezt követően hematoxilines magfestést végeztünk.

3.7.4. Az immunfestődés intenzitásának értékelése

Az immunhisztokémiai értékelés szemikvantitatív módon történt (129). Az elemzésnél előzetesen ismert immunhisztokémiailag pozitívan festődő szövetmintákat használtunk pozitív kontrollként, az immunhisztokémiailag negatív kontroll minták esetében az elsődleges antitesteket fiziológiás sóoldattal helyettesítettük. Az immunhisztokémia után fénymikroszkóp alatt (400x nagyítás) a megfelelően orientált, teljes cryptákban, axiálisan, a cryptafal mentén megszámoltuk a pozitív sejtmagokat az összeshez képest. A pozitívan festődő sejtmagok száma elosztva az összesen leszámolt sejtmag számmal százalékos értékben kifejezve adta meg a festődési indexet (labeling index, LI). Csak azokat a sejteket tekintettük pozitívnak, amelyek a mikrométer csavar folyamatos, finom állítása mellett teljes szélességükben barnás-feketének (TUNEL) ill. vöröses-barnának (PCNA, p53, EGFR) látszottak. Mintánként legalább 600, átlagosan 800 hámsejtet vizsgáltunk meg.

3.7.5. Statisztikai számítás

Az adatok statisztikai elemzése ANOVA one-way, LSD teszt és korrelációs analízis segítségével történt Statistica for Windows (4.3 verzió) programcsomaggal. A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.8. Tartós PPI kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

3.8.1. Beteganyag

A tartós (6 hónapos) PPI kezelésnek a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára kifejtett hatását *H. pylori* negatív reflux oesophagitiszes betegekben (n=26) tanulmányoztuk (14 férfi, 12 nő, átlagéletkor 46.2 év, 29-63 év között), akik hat hónapig napi 20 mg omeprazol (n=14) vagy napi 40 mg esomeprazol kezelésben (n=12) részütek. A hámsejt proliferáció (PCNA), az apoptózis-TUNEL, a p53 és az EGFR expressziót a gyomor antralis nyálkahártyájában immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a PPI kezelés bevezetése előtt ill. a hat hónapos PPI kezelést követően.

A **PCNA, p53, apoptózis, és EGFR** immunhisztokémiai vizsgálatok a fentiekben részletezett módon történtek (3.6.2; 3.6.3; 3.7.2. és 3.7.3. alfejezetek).

3.8.2. Statisztikai számítás

Az adatok statisztikai elemzése ANOVA one-way és LSD teszt, valamint korrelációs számítás segítségével történt (Statistica for Windows, 4.3 verzió programcsomag). A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

3.9. Az SLPI expresszió vizsgálata különböző etiológiájú gastritisekben

3.9.1. Beteganyag

Az SLPI expressziót immunhisztokémiai módszerrel 85 paraffinba ágyazott szöveti metszetben tanulmányoztuk az alábbi, nemek szerint megfelelően arányos csoportosításban: *H. pylori*-asszociált gastritis (n=13, átlagéletkor 53.6 év, 32-93 év között), NSAID-asszociált gastritis (n=18, átlagéletkor 35.7 év, 23-73 év között), autoimmun gastritis (n=11, átlagéletkor 64.5 év, 52-72 év között), lymphocitás gastritis (n=26, átlagéletkor 55.9 év, 24-90 év között), valamint *H. pylori* negatív, szövettani eltérés nélküli kontroll csoport (n=17, átlagéletkor 30.6 év, 19-53 év között). A gastritisek osztályozása a Sydney klasszifikáció szerint történt.

3.9.2. Az SLPI immunhisztokémiai expressziója

Az 5µm vastagságú metszeteket deparaffináltuk és rehidráltuk. Az antigénfeltáráshoz a mintákat pH 6.0-os 0.01 M citrát pufferbe helyeztük, majd háromszor 10 percig 600 W teljesítménnyel mikrohullámú sütőben forraltuk. Ezt követően a mintákat 5% RPMI, 5% foetalis borjú szérum és nátrium-azide (pH 7.4-7.6) tartalmú pufferban, 30 percig inkubáltuk. Az elsődleges antitesttel történő inkubáció szobahőmérsékleten 1-2 óráig tartott. A mintákat polyclonalis anti-SLP nyúl-antiszérummal kezeltük (Vivotec GmbH, Magdeburg, Németország) (130, 131). A következő lépésekben Vectastatin ABC-AP Kittet használtunk (Vector, Burlingame, CA, USA). A jelkonvertáló reakció leállítása után hematoxilines festést végeztünk. Az immunfestődés intenzitásának értékelése szemikvantitatív módon történt. A hámsejtek és immunsejtek SLPI festődésének intenzitását a festődés hiánya (0) ill. enyhe (1), közepes (2) és kifejezett festődés (3) alapján 0 és 3 között értékeltük.

3.9.3. Statisztikai számítás

Az adatok statisztikai elemzése ANOVA one-way teszt segítségével történt (Microgal Origin 5.0 programcsomag, Northhampton, Massachusetts, USA). A szignifikancia határa $P < 0.05$ volt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Cisztein és szerin proteázok szöveti vizsgálata CRC-ben

4.1.1. Proteáz szöveti antigén koncentrációk colorectalis daganatos és daganatmentes szövetben

CRC-ben a CATL, uPA és PAI-1 esetében szignifikánsan nagyobb szöveti antigén koncentrációkat találtunk a colorectalis daganatos szövetben a daganatmentes szövethez képest. A CATB esetében a különbség nem érte el a szignifikancia határát (2. táblázat).

	DAGANAT (n=60)	NORMÁLIS (n=60)	P
CATB	311.1 ± 229.9	243.9 ± 170.1	0.1 > P > 0.05
CATL	293.6 ± 138.6	261.4 ± 120.2	P < 0.05
uPA	1.83 ± 1.00	0.30 ± 0.13	P < 0.0001
TPA	1.76 ± 1.07	4.05 ± 1.95	P < 0.0001
PAI-1	3.53 ± 5.74	0.40 ± 0.33	P < 0.0001

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; DAGANAT: colorectalis daganatos szövet; NORMÁLIS: colorectalis daganatmentes szövet

2. táblázat. A cisztein és szerin proteázok szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában: daganatos és daganatmentes szövetben

(ng/mg protein) (n=60) (átlag ± standard deviáció, SD)

4.1.2. Proteáz szöveti antigén koncentrációk az áttétek függvényében

A CATB, CATL és a PAI-1 szöveti antigén koncentrációi szignifikánsan nagyobbak bizonyultak az áttétet adó CRC-ben (n=39) az áttét nélküli (n=21) daganatokhoz képest (CATB: 300 vs 203 ng/mg protein, $P < 0.005$; CATL: 308 vs 240 ng/mg protein, $P < 0.01$; PAI-1: 2.00 vs 1.18 ng/mg protein; $P < 0.01$).

4.1.3. Proteáz szöveti koncentrációk a daganatos grading függvényében

A rosszul differenciált daganatokban szignifikánsan nagyobb uPA és PAI-1 antigén koncentrációkat találtunk a jól differenciált daganatokhoz képest (3. táblázat).

	CATB	CATL	uPA	PAI-1	TPA
Jól diff. (G1) (n=7)	462±367	344±337	0.75±0.34	0.49±0.22	1.06±0.6
Kp. diff. (G2) (n=47)	286±189	284±91	1.91±0.97	3.03±4.11	1.83±1.0
Roszul diff. (G3) (n=6)	325±307	306±90	2.49±0.86	10.8±12.4	2.08±1.2
ANOVA one-way	$P=NS$	$P=NS$	$P < 0.01$	$P < 0.0001$	$P=NS$

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; G1: jól differenciált colorectalis carcinoma; G2: közepesen differenciált colorectalis carcinoma; G3: rosszul differenciált colorectalis carcinoma; NS= nem szignifikáns

3. táblázat. A cisztein és szerin proteázok szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában a daganatos differenciáció függvényében

(ng/mg protein) (n=60) (átlag ± SD)

4.1.4. Proteáz szöveti koncentrációk a Dukes stádium függvényében

Előrehaladott Dukes stádiumokban szignifikánsan nagyobb PAI-1 szöveti antigén koncentrációkat találtunk (4. táblázat).

	CATB	CATL	uPA	PAI-1	TPA
DUKES A (n=9)	285±305	348±278	1.8±1.1	1.1±0.7	1.5±0.8
DUKES B (n=12)	285±161	250±44	1.4±0.7	2.6±5.1	1.9±1.2
DUKES C (n=18)	280±160	294±97	1.6±0.8	2.0±1.5	1.8±0.9
DUKES D (n=21)	363±279	293±118	2.1±1.1	6.2±8.2	1.6±1.2
ANOVA one-way	<i>P</i> =NS	<i>P</i> =NS	<i>P</i> =NS	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> =NS
Student t-teszt			D vs B <i>P</i> <0.05		

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; DUKES A: Dukes A stádium; DUKES B: Dukes B stádium; DUKES C: Dukes C stádium; DUKES D: Dukes D stádium; NS: nem szignifikáns

4. táblázat. A cisztein és szerin proteázok szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában a Dukes stádiumok függvényében

(ng/mg protein) (n=60) (átlag ± SD)

4.1.5. Szöveti proteázok összefüggése egyéb prognosztikai tényezőkkel

Szignifikánsan nagyobb PAI-1 (4.50 vs 1.28 ng/mg protein; $P=0.002$) és uPA (2.53 vs 1.58 ng/mg protein; $P=0.01$) szöveti antigén koncentrációkat mértünk vascularis invasio esetében. A PAI-1 értékek a daganatos necrosis jelenlétében is szignifikánsan nagyobbak voltak (2.17 vs 1.31 ng/mg protein; $P=0.04$). Nem találtunk szignifikáns összefüggést a nyáktermeléssel, az életkorral, a nemmel, vagy a daganat lokalizációjával.

4.1.6. Proteázok szöveti koncentrációinak egymás közötti összefüggése

CRC-ben a standard lineáris korrelációs elemzés során a CATB és CATL (korrelációs koefficiens $r=0.59$; $P=0.0000001$); az uPA és PAI-1 ($r=0.46$; $P=0.0000001$); a CATB és uPA ($r=0.18$; $P=0.04$); a CATL és uPA ($r=0.17$; $P=0.045$); valamint a CATL és PAI-1 ($r=0.19$; $P=0.02$) szöveti antigén koncentrációk között szignifikáns korrelációt találtunk.

Ahogy várható volt, a TPA szöveti antigén koncentrációi fordított összefüggést mutattak az uPA ($r= - 0.33$; $P=0.0001$) és a PAI-1 ($r= - 0.26$; $P=0.003$) szöveti antigén koncentrációival.

4.1.7. A szöveti proteázok prognosztikai szerepe

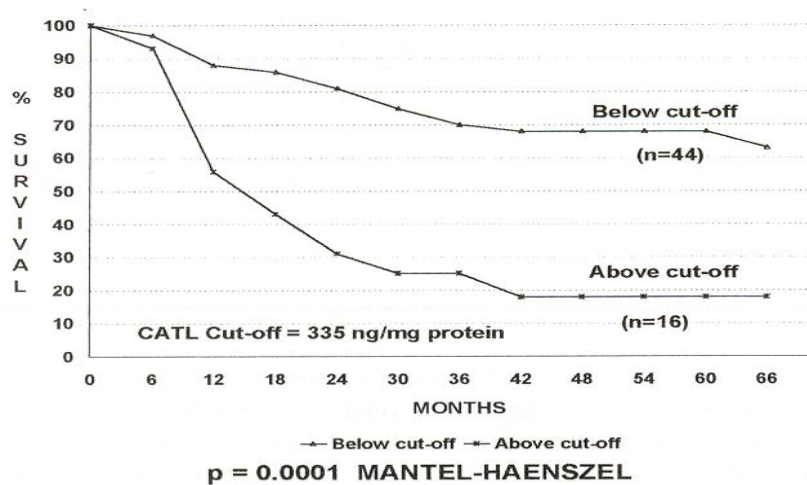
A proteázok lehetséges prognosztikai szerepének tanulmányozásához a daganatos szövetben a ROC görbék és a Youden J teszt segítségével meghatároztuk a proteázok optimális határértékeit (cut-off értékeit): a CATB optimális cut-off értéke 417 ng/mg protein (Youden $J=0.13$); CATL: 335 ng/mg protein ($J=0.38$); uPA: 2.77 ng/mg protein (Youden $J=0.35$); TPA: 2.15 ng/mg protein (Youden $J=0.17$); míg a PAI-1 optimális cut-off értéke 3.10 ng/mg protein (Youden $J=0.64$).

A betegek követése során 28 beteg (46.7%) halt meg a CRC-vel összefüggésben (átlagos túlélés 15.5 hónap, 95%-os konfidencia határ, 95%CL: 8.0-25 hónap; 5-60 hónap között). A követés végén 32 beteg maradt életben (53.3%) (átlagos túlélés 37.5 hónap, 95%CL: 34-44 hónap, 32-70 hónap között). Az összes betegre ($n=60$) kivetített átlagos túlélés 33 hónapnak bizonyult (95%CL: 28-36). A reseálható daganatos betegek (Dukes A-C) átlagos túlélése (36 hónap, 95%CL: 34-43 hónap) szignifikánsan jobb volt, mint az inoperábilis Dukes D betegek átlagos túlélése (11 hónap, 95%CL: 6-29 hónap; $P<0.005$).

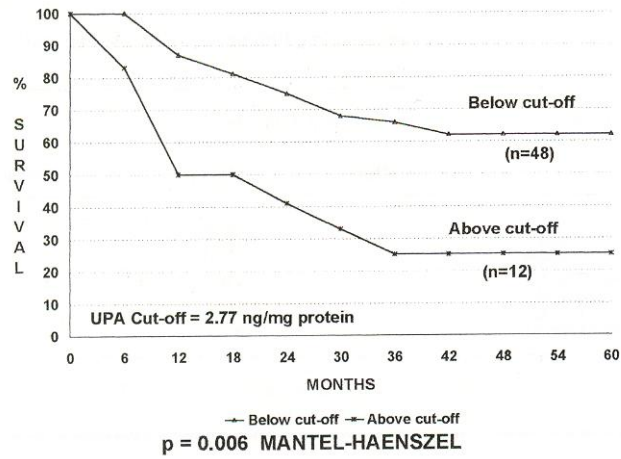
A Mantel-Haenszel túlélési görbék segítségével az alábbi paraméterek esetében találtunk szignifikáns összefüggéseket a túléléssel:

- CATL szöveti antigén koncentrációk ($P=0.0001$) (1. ábra);
- uPA szöveti antigén koncentrációk ($P=0.006$) (2. ábra);
- PAI-1 szöveti antigén koncentrációk ($P=0.006$) (3. ábra);
- Dukes stádium ($P=0.0001$);
- áttétek jelenléte ($P=0.003$),
- vascularis invasio jelenléte ($P=0.03$).

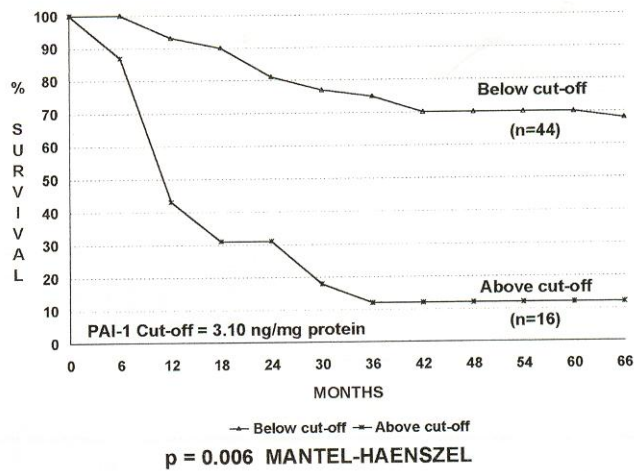
A CATB, a TPA, a daganatos differenciáció, a nyáktermelés, a daganatos necrosis, az életkor, a nem, vagy a daganat lokalizációja esetén nem találtunk összefüggést a túléléssel.



1. ábra. Túlélési görbék a CATL szöveti antigén koncentrációk függvényében colorectalis carcinomában (n=60)



2. ábra. Túlélési görbék az uPA szöveti antigén koncentrációk függvényében colorectalis carcinomában (n=60)



3. ábra. Túlélési görbék a PAI-1 szöveti antigén koncentrációk függvényében colorectalis carcinomában (n=60)

4.1.8. Az uPA-R szöveti koncentrációi CRC-ben

Az uPA-R szöveti antigén koncentrációit a PA/PAI-1 rendszerrel (uPA, TPA és PAI-1) együtt egy másik beteganyagban, 35 CRC beteg esetében vizsgáltuk.

Szignifikánsan nagyobb uPA-R antigén koncentrációkat találtunk:

- a.) a daganatos szövetben a daganatmentes szövethez képest (5. táblázat);
- b.) a rosszul differenciált (G3) daganatokban a jól differenciált (G1) daganatokhoz képest (6. táblázat);
- c.) az áttéteket adó (n=19) CRC-ben az áttét nélküli (n=16) esetekhez képest (4. ábra);
- d.) az előrehaladott Dukes stádiumokban (7. ábrázat).

Az uPA-R szignifikáns korrelációt mutatott az uPA ($r=0.75$; $P=0.00000001$), valamint a PAI-1 ($r=0.51$; $P=0.001$) szöveti antigén koncentrációival.

	DAGANAT (n=35)	NORMÁLIS (n=35)	P
uPA-R	1.92 ± 1.06	0.56 ± 0.21	$P<0.001$
uPA	1.88 ± 1.03	0.33 ± 0.13	$P<0.001$
TPA	1.78 ± 0.87	4.06 ± 2.16	$P<0.001$
PAI-1	3.07 ± 6.07	0.32 ± 0.31	$P<0.001$

Rövidítések: uPA-R: urokinase típusú plasminogén activator receptor; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; DAGANAT: colorectalis daganatos szövet; NORMÁLIS: colorectalis daganatmentes szövet

5. táblázat. Az uPA-R, uPA, TPA és PAI-1 szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában: daganatos és daganatmentes szövetben

(ng/mg protein) (n=35) (átlag ± SD)

	uPA-R	uPA	PAI-1	TPA
Jól diff. (G1) (n=6)	0.9±0.4	0.8±0.3	0.4±0.2	1.2±0.5
Kp. diff. (G2) (n=23)	1.8±0.9	1.9±1.0	1.7±1.3	1.8±0.8
Rosszul diff. (G3) (n=6)	3.0±1.0	2.5±0.8	10.8±12.4	2.1±1.2
ANOVA one-way	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.001	<i>p</i> =NS

Rövidítések: uPA-R: urokinase típusú plasminogén activator receptor; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; Jól diff. (G1): Jól differenciált colorectalis carcinoma; Kp. diff. (G2): Közepesen differenciált colorectalis carcinoma; Rosszul diff. (G3): rosszul differenciált colorectalis carcinoma; NS: nem szignifikáns

6. táblázat. Az uPA-R, uPA, TPA és PAI-1 szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában a daganatos differenciáció függvényében

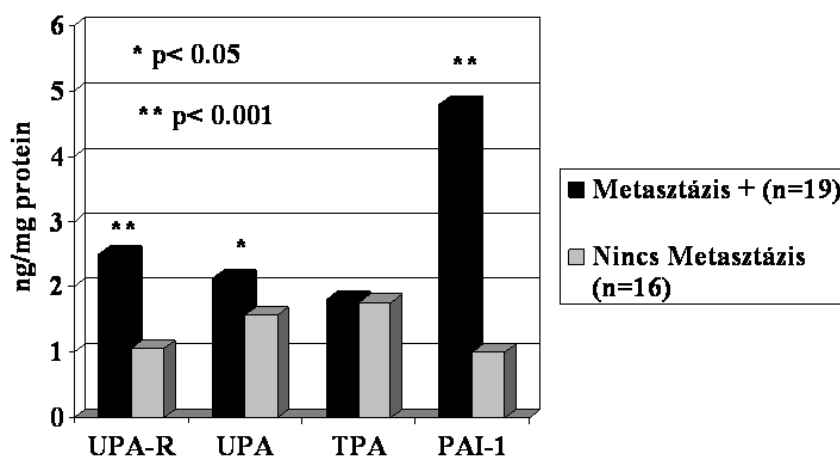
(ng/mg protein) (n=35) (átlag ± SD)

	uPA-R	uPA	PAI-1	TPA
Dukes A (n=9)	1.1±0.4	1.9±1.1	1.1±0.7	1.5±0.8
Dukes B (n=7)	1.3±0.7	1.2±0.8	0.8±0.6	2.0±0.8
Dukes C (n=10)	2.0±0.8	1.8±0.9	1.9±1.1	1.9±0.8
Dukes D (n=9)	3.0±0.9	2.4±0.9	8.0±10.7	1.6±1.0
ANOVA one-way	<i>P</i> =0.001	<i>P</i> =NS	<i>P</i> =0.03	<i>P</i> =NS

Rövidítések: uPA-R: urokinase típusú plasminogén activator receptor; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; TPA: szöveti-típusú plasminogén activator; PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; DUKES A: Dukes A stádium; DUKES B: Dukes B stádium; DUKES C: Dukes C stádium; DUKES D: Dukes D stádium; NS: nem szignifikáns

7. táblázat. Az uPA-R, uPA, TPA és PAI-1 szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában a Dukes stádiumok függvényében

(ng/mg protein) (n=35) (átlag ± SD)



4. ábra. Az uPA-R szöveti antigén koncentrációi colorectalis carcinomában az áttétek függvényében (ng/mg protein) (n=35)

4.1.9. Megbeszélés

Az általunk vizsgált proteázok (a cisztein proteáz CATB, CATL és a szerin proteáz csoporthoz tartozó PA rendszer, valamint a PAI-1) szöveti viselkedését egyazon colorectális tumoros beteganyagban elsőként tanulmányoztuk az irodalomban (132, 133).

Az alábbi eredményeink arra utalnak, hogy a cathepsinek és a PA/PAI-1 rendszer fontos szerepet töltenek be a CRC biológiájában, és különösen a daganat progressziójában:

1. a szignifikánsan magasabb proteáz koncentrációk az egyazon betegből származó daganatos szövetben a daganatmentes szövethez képest;
2. a szignifikánsan magasabb antigén koncentrációk az áttétet adó CRC esetében;
3. a szignifikánsan magasabb antigén koncentrációk a rosszul differenciált (G3) tumorokban;
4. a szignifikánsan magasabb antigén koncentrációk összefüggése az előrehaladott Dukes stádiumokkal.

A cathepsinek és a PA/PAI-1 rendszer szöveti koncentrációinak egymás közötti szignifikáns korrelációja megerősíti a korábbi kísérletes adatokat, miszerint ez a két

proteolyticus enzimrendszer egyidejűleg aktiválódik a daganat-biológiában (10, 11, 12, 18, 19).

Eredményeinknek fontos biológiai és klinikai jelentősége van. Az utóbbi évtizedben, a pre- és posztoperatív kezelés fejlődése ellenére, a CRC prognózisa csak kis mértékben javult. Igen hasznos lenne, ha újabb prognosztikai tényezőkkel rendelkezhetnénk, amelyek segítségével könnyebben ki tudnánk választani azokat a CRC betegeket, akiknél valóban nélkülözhetetlen az adjuváns vagy a neoadjuváns kezelés. A mindennapi gyakorlatban a Dukes stádium a legelterjedtebben alkalmazott colorectalis prognosztikai rendszer. Számos közlemény CRC esetében újabb paraméterek prognosztikai szerepére hívja fel a figyelmet, mint pl. a daganatos DNS index és ploiditás, az emelkedett preoperatív C-reaktív protein, a vascularis invasio, a nyirokér invasio, a perineuralis invasio, a necrosis mértéke, a szerotonin- és nyáktermelés, vagy a daganatot infiltráló lymphociták sűrűsége (134-145).

Igazoltuk, hogy a CATL, az uPA és a PAI-1 szöveti antigén koncentrációi szoros összefüggést mutatnak a túléléssel. Eredményeink arra utalnak, hogy a fenti szöveti proteázok igen érzékeny prognosztikai tényezők CRC-ben. A szöveti proteázok meghatározása azzal a gyakorlati előnnyel járhat, hogy már preoperatív szakban, tehát még a Dukes stádium meghatározása előtt, fontos prognosztikai információkkal szolgálhat a klinikus számára.

A cathepsinek és a PA rendszer a közeljövőben akár újabb terápiás célpontként is szerepelhetnek: részben közvetlenül a cathepsinek és az uPA bénítása révén, másrészt közvetett módon, az uPA-R gátlásával (146-157).

4.2. A proteolyticus enzimek tumor márkere szerepe

4.2.1. Proteázok tumor márkere szerepe CRC-ben

4.2.1.1. Proteáz szérums/plazma koncentrációk CRC-ben

CRC-ben a proteázok tumor márkere szerepének tanulmányozása során a szérums CATB, CATL és a plazma uPA, PAI-1 antigén koncentrációit a CRC diagnózisának felállítása pillanatában összehasonlítottuk a gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott tumor márkerek (CEA és CA 19-9) szérums koncentrációival. A szérums ill. plazma CATB, CATL, uPA, PAI-1, valamint CEA és CA 19-9 koncentrációkat a vizsgált csoportokban (CRC, CU, colorectalis adenoma, kontroll csoport) a 8. táblázat foglalja össze. Szignifikánsan magasabb szérums CATB, CATL és plazma uPA és PAI-1 antigén koncentrációkat mértünk CRC-ben a többi csoporthoz képest. A CEA és a CA 19-9 esetében a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. A colorectalis adenomás csoportban a CATB, CATL és PAI-1 antigén koncentrációk szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll csoportban.

	CATB	CATL	uPA	PAI-1	CEA	CA 19-9
CRC (n=56)	8.75*§ (2.4-39.3)	1.10*§ (1.0-35.3)	0.29*§ (0.1-0.79)	52.45*§ (13.5-138.6)	2.40 (0.4-235)	9.15 (1.0-540)
CU (n=25)	4.37 (2.8-7.2)	1.10 (1.0-1.7)	0.20 (0.18-0.23)	12.60 (8.8-17.6)	3.15 (0.8-11.5)	9.00 (4.5-32.0)
Adenoma (n=26)	4.45# (4.2-10.3)	1.25# (1.0-6.5)	0.20 (0.16-0.53)	14.05# (10.5-65.5)	3.55 (0.7-5.7)	10.27 (3.7-41.0)
Kontroll (n=35)	3.80 (1.4-5.8)	1.00 (1.0-2.1)	0.19 (0.16-0.27)	10.70 (1.87-23.8)	2.90 (0.8-18.9)	8.90 (1.3-47.4)
Kruskall-Wallis	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P = \text{NS}$	$P = \text{NS}$

Statisztika:

* CRC: $P < 0.001$ vs Kontroll; § CRC: $P < 0.05$ vs CU és Kontroll

Adenoma: $P < 0.001$ vs Kontroll

Rövidítések: CRC: colorectalis carcinoma; CU: colitis ulcerosa; Adenoma: colorectalis adenoma; Kontroll: daganatmentes kontroll csoport; CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embriónális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; Kruskall-Wallis: Kruskall-Wallis variancia analízis; NS: Nem szignifikáns

8. táblázat. A CATB, CATL, uPA, PAI-1 és a CEA, CA 19-9 szérums ill. plazma antigén koncentrációi colorectalis carcinómában, colitis ulcerosában, colorectalis adenómában és kontroll csoportban (ng/ml) (közéérték és változási tartomány)

4.2.1.2. Proteáz koncentrációk a Dukes stádium függvényében

A Dukes osztályozást illetően a legmagasabb CATB, PAI-1, CEA és CA 19-9 koncentrációkat a Dukes D daganatok esetében mértük (9. táblázat).

Nem találtunk szignifikáns összefüggést a daganatos differenciációval (grading), az életkorral, a nemmel, vagy a daganat lokalizációjával.

Stádium	CATB	CATL	uPA	PAI-1	CEA	CA 19-9
DUKES A (n=7)	4.50 (2.4-37.3)	1.10 (1.0-35.3)	0.30 (0.2-0.62)	32.81 (17.2-66.7)	3.00 (0.6-3.4)	6.80 (3.0-11.5)
DUKES B (n=12)	6.75 (3.2-23.8)	1.00 (1.0-12.3)	0.29 (0.1-0.79)	39.09 (13.5-108.1)	2.00 (0.6-21.1)	7.65 (1.0-35.0)
DUKES C (n=23)	8.60 (3.6-35.7)	1.10 (1.0-34.1)	0.26 (0.1-0.79)	52.54 (13.8-126.4)	2.20 (0.4-235.0)	9.20 (1.0-78.6)
DUKES D (n=14)	24.25*§ (9.2-39.3)	4.55 (1.0-35.2)	0.29 (0.12-0.42)	82.03** (38.7-138.6)	8.30# (1.9-74.6)	35.85** (4.6-540)
Kruskall-Wallis variancia analízis	$P=0.0002$	$P=NS$	$P=NS$	$P=0.01$	$P=0.003$	$P=0.001$

Statisztika:

* $P<0.01$, Dukes D vs Dukes A és B

§ $P<0.05$, Dukes D vs Dukes C

** $P<0.05$, Dukes D vs Dukes A, B és C

$P<0.01$, Dukes D vs Dukes A, B és C

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embriónális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; DUKES A: Dukes A stádium; DUKES B: Dukes B stádium; DUKES C: Dukes C stádium; DUKES D: Dukes D stádium; NS: Nem szignifikáns;

9. táblázat. A CATB, CATL, uPA, PAI-1 és a CEA, CA 19-9 szérum ill. plazma antigén koncentrációi colorectalis carcinomában a Dukes stádiumok függvényében (ng/ml) (n=56) (közéérték és változási tartomány)

4.2.1.3. Proteáz koncentrációk diagnosztikus hatékonysága CRC-ben

A proteázok lehetséges CRC tumor márkerek vizsgálatához a ROC görbék és a Youden J teszt segítségével meghatároztuk a proteázok optimális határértékeit (cut-off értékeit): a CATB optimális cut-off értéke 4.60 ng/ml (Youden J=0.68); CATL: 1.12 ng/ml (Youden J=0.25); uPA: 0.21 ng/ml (Youden J=0.53); a PAI-1 optimális cut-off értéke pedig 18.90 ng/ml-nek (Youden J=0.75) bizonyult. A CEA (4.0 ng/ml) és a CA 19-9 (37.0 ng/ml) esetében a gyártó által meghatározott cut-off értékeket vettük figyelembe.

A szenzitivitás alatt a daganatos csoportban azon teszt-pozitív, daganatos betegek arányát értettük, akiknél az egyes márkerek meghaladták az adott cut-off értéket. Specificitás esetén a teszt-negatív, nem daganatos betegek (egészséges kontroll egyének, CU vagy colorectalis adenomás betegek) arányát vettük figyelembe.

Ha a vizsgált paramétereket (proteázok, CEA és CA 19-9) a fenti cut-off értékek mellett vizsgáltuk, a diagnózis felállításának pillanatában a PAI-1 (94%), a CATB (82%), az uPA (69%) és a CATL (41%) szenzitivitása jobban jelezte a CRC jelenlétét, mint a CEA (30%) vagy a CA 19-9 (18%). A CATB (88%) és a PAI-1 (84%) specificitása megegyezett a jól ismert tumor márkerek specificitásával (CA 19-9: 93%; CEA: 89%) (10. táblázat).

A PPV (a CRC felismerésének esélye pozitív teszt esetében) és az NPV (a CRC kizárhatósága negatív teszt esetében) nagymértékben függnek a pozitív prevalenciától (a daganatos betegek arányától a vizsgált teljes populációban, jelen esetben: $56/142=39\%$) ill. a negatív prevalenciától (a daganatmentes betegek arányától a vizsgált teljes populációban, $86/142=61\%$). A gyakorlatban a PPV és az NPV akkor nyújt hasznos információt, ha a PPV és a pozitív prevalencia, ill. az NPV és a negatív prevalencia közötti különbség eléri a 20%-ot. Ennek értelmében a PPV CATB, uPA, PAI-1, CEA és CA 19-9 esetében figyelemre méltó (kevésbé CATL esetében); ezzel szemben az NPV-nek CATB, PAI-1 és uPA esetében van jelentősége, de alig értékelhető CATL, CEA vagy CA 19-9 esetében (10. táblázat).

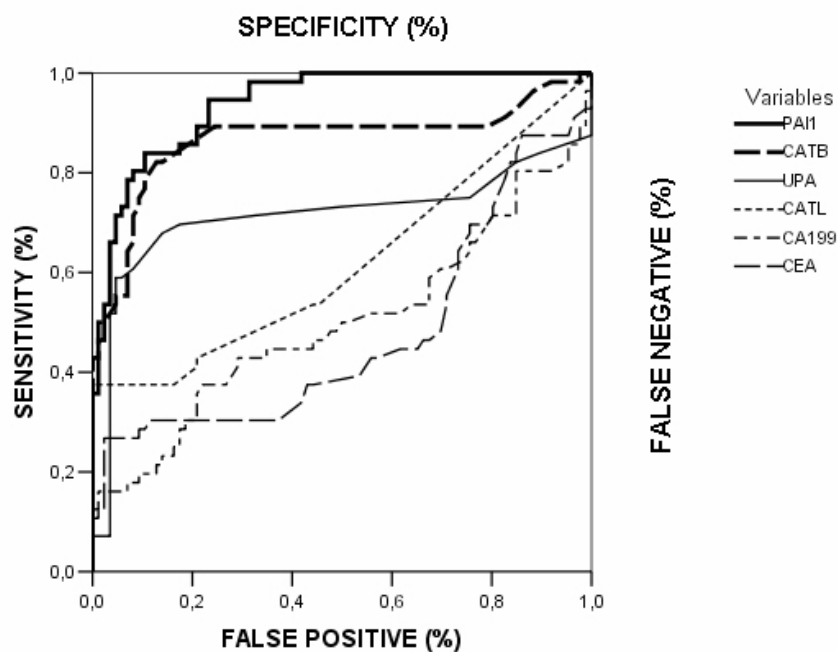
A PAI-1, a CATB és az uPA diagnosztikus hatékonysága meghaladta a CEA, CATL vagy a CA 19-9 hatékonyságát; a PAI-1 diagnosztikus hatékonysága bizonyult a legjobbnak (88%) (10. táblázat).

	CATB	CATL	uPA	PAI-1	CEA	CA 19-9
Cut-off érték	(4.60)	(1.12)	(0.21)	(18.90)	(4.0)	(37.0)
Szenzitivitás (%)	82	41	69	94	30	18
Specifititás (%)	88	80	82	84	89	93
PPV (%)	82	58	72	79	65	62
PPV-Pozitív Prevalencia (%)	43	19	33	40	26	23
NPV (%)	88	68	80	96	66	63
NPV-Negatív Prevalencia (%)	27	7	19	35	5	2
Hatékonyság (%)	86	65	77	88	66	63
Fisher-teszt	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> =0.008	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> <0.0001	<i>P</i> =0.004	<i>P</i> =0.06

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embrionális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; Cut-off: cut-off értékek (ng/ml); PPV: Pozitív prediktív érték; NPV: Negatív prediktív érték; Pozitív prevalencia: a daganatos betegek aránya a vizsgált teljes populációban: 56/142=39%; Negatív prevalencia: a daganatmentes betegek aránya a vizsgált teljes populációban: 86/142=61%; PPV-Pozitív prevalencia: a PPV és a pozitív prevalencia közötti különbség; NPV-Negatív prevalencia: az NPV és a negatív prevalencia közötti különbség; Hatékonyság: diagnosztikus hatékonyság

10. táblázat. A proteolyticus enzimek (CATB, CATL, uPA és PAI-1) és a CEA, CA 19-9 diagnosztikus hatékonysága (szenzitivitása, specifitása, pozitív és negatív prediktív értéke) colorectalis carcinomában (n=56)

A vizsgált paraméterek klinikai jelentőségét jól ábrázolják a ROC görbék. A PAI-1 és a CATB ROC görbéi közelebb helyezkednek el az elméleti 100%-os szenzitivitáshoz és specifitáshoz, mint a többi márkör görbéi (5. ábra).



5. ábra. A proteolyticus enzimek és a CEA, CA 19-9 ROC görbái colorectalis carcinómában (n=56)

A CATB, CATL, uPA, PAI-1 és a CEA, CA 19-9 klinikai jelentőségének összehasonlítására jól alkalmazhatók a ROC görbék. A PAI-1 és a CATB ROC görbái közelebb helyezkednek el az ideális szenzitivitáshoz és specifitáshoz, mint a többi márkörbék.

Az uPA és CATL ROC görbái is meghaladják a CA 19-9 és a CEA görbéket.

A ROC görbék görbe alatti területei (AUC) lehetővé teszik, hogy még pontosabban értékeljük az egyes paraméterek hatékonyságát és diszkriminatív erejét. Ezúttal is a PAI-1 és a CATB hatékonysága meghaladja a többi vizsgált paraméter hatékonyságát (11. táblázat).

Változó	AUC	Alsó határ	Felső határ
PAI-1	0.9385	0.9025	0.9744
CATB	0.8665	0.7934	0.9397
uPA	0.7143	0.6091	0.8196
CATL	0.6173	0.5158	0.7188
CA 19-9	0.4990	0.3937	0.6043
CEA	0.4748	0.3690	0.5807

Rövidítések: AUC: görbe alatti terület; CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embriónális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; ROC: receiver operating characteristics

11. táblázat. Proteolyticus enzimek és CEA, CA 19-9: a ROC görbék görbe alatti területei (AUC)

4.2.1.4. Többtényezős tumor márkerek elemzés CRC-ben

A többtényezős (multiparametrikus) tumor márkerek elemzés adatait a 12. táblázat foglalja össze. Azonos vérmintából két márkerek egyidejű meghatározásakor a legmagasabb szenzitivitást a PAI-1 és CATB, ill. a PAI-1 és uPA kombinációjával érték le (mindkét márkerek teszt-pozitív a daganatos csoportban 78%-ban ill. és 64%-ban; legalább egy márkerek helyesen teszt-pozitív a daganatos csoportban mindkét esetben 98%-ban). A CEA vagy a CA 19-9 és egy proteáz kombinációjának szenzitivitása meghaladta a CEA vagy a CA 19-9 önálló szenzitivitását. Három márkerek egyidejű vizsgálata (egy proteáz és a CEA vagy a CA 19-9 kombinációja) esetén nem észleltünk további szenzitivitás növekedést.

A CEA vagy a CA 19-9 és egy proteáz kombinációja, vagy a CEA és CA 19-9 kombinációja esetén a specificitás jobban jelezte a helyesen daganatmentes betegeket (egy vagy két márkerek helyesen teszt-negatív a daganatmentes csoportban), mint önállóan a CEA vagy a CA 19-9. Két proteáz együttes vizsgálata esetén a kombinált specificitás (egy vagy két márkerek helyesen teszt-negatív a daganatmentes csoportban) szintén nagyobb volt, mint a CATB, CATL, uPA vagy a PAI-1 önmagában vett specificitása. Három márkerek egyidejű vizsgálata (egy proteáz és a CEA vagy CA 19-9 kombinációja) nem növelte tovább a specificitást (12. táblázat).

Colorectalis carcinoma (n=56)				
	Szenzitivitás		Specifitás	
Két márkert	<i>Mindkét márkert pozitív</i>	<i>Egyik márkert pozitív</i>	<i>Mindkét márkert negatív</i>	<i>Egyik márkert negatív</i>
PAI-1 + CATB	78%	98%	73%	98%
PAI-1 + uPA	64%	98%	67%	98%
PAI-1 + CATL	39%	96%	67%	96%
CATB + uPA	55%	95%	79%	87%
CATB + CATL	41%	84%	75%	94%
CATL + uPA	30%	80%	72%	90%
PAI-1 + CEA	30%	96%	73%	98%
CATB + CEA	28%	84%	83%	95%
uPA + CEA	20%	80%	76%	95%
CATL + CEA	20%	52%	75%	94%
PAI-1 + CA 19-9	18%	96%	77%	98%
CATB + CA 19-9	16%	84%	86%	97%
uPA + CA 19-9	14%	73%	80%	95%
CATL + CA 19-9	11%	48%	78%	95%
CEA + CA 19-9	16%	32%	86%	97%
Három márkert	<i>Összes márkert pozitív</i>	<i>Egyik márkert pozitív</i>	<i>Összes márkert negatív</i>	<i>Egyik márkert negatív</i>
PAI-1 +CEA +CA 19-9	16%	96%	71%	98%
CATB +CEA +CA 19-9	14%	84%	80%	97%
uPA +CEA +CA 19-9	12%	80%	74%	97%
CATL +CEA +CA 19-9	9%	52%	74%	97%

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embrionális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; Egyik márkert: legalább egy márkert helyesen teszt-pozitív vagy teszt-negatív; Mindkét márkert: mindkét márkert helyesen teszt-pozitív vagy teszt-negatív; Összes márkert: mindhárom márkert helyesen teszt-pozitív vagy teszt-negatív

12. táblázat. Többtényezős (multiparametrikus) tumor márkert elemzés colorectalis carcinomában (n=56)

4.2.1.5. A szérum/plazma proteázok egymás közötti összefüggése

A CRC betegek vérmintáiból meghatározott proteázok egymás közötti korrelációjának vizsgálatokor a CATB antigén koncentrációja szignifikáns összefüggést mutatott a CATL, uPA és PAI-1 antigén koncentrációkkal. További szignifikáns összefüggést találtunk a PAI-1 és CATL, valamint a PAI-1 és uPA antigén koncentrációk között. A CEA és a CA 19-9 koncentrációi is összefüggtek egymással. Amikor CRC-ben a CEA, CA 19-9 és a proteázok közötti összefüggéseket vizsgáltuk, a CEA és a CA 19-9 egyaránt korrelált a CATB és a PAI-1 antigén koncentrációival (13. táblázat).

Colorectalis carcinoma (n=56)		
	<i>P</i> érték	korrelációs koefficiens
CATB/CATL	<i>P</i> =0.0001	(rS=0.67)
CATB/uPA	<i>P</i> =0.03	(rS=0.28)
CATB/PAI-1	<i>P</i> =0.04	(rS=0.27)
CATL/uPA	<i>P</i> =0.11	(rS=0.21)
PAI-1/CATL	<i>P</i> =0.03	(rS=0.27)
PAI-1/uPA	<i>P</i> =0.001	(rS=0.41)
CEA/CA 19-9	<i>P</i> =0.0003	(rS=0.46)
CEA/CATB	<i>P</i> =0.002	(rS=0.40)
CEA/CATL	<i>P</i> =0.06	(rS=0.25)
CEA/uPA	<i>P</i> =0.70	(rS=0.05)
CEA/PAI-1	<i>P</i> =0.002	(rS=0.40)
CA 19-9/CATB	<i>P</i> =0.005	(rS=0.36)
CA 19-9/CATL	<i>P</i> =0.33	(rS=0.13)
CA 19-9/uPA	<i>P</i> =0.46	(rS=0.10)
CA 19-9/PAI-1	<i>P</i> =0.005	(rS=0.36)

Rövidítések: CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embrionális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbohidrát antigén; rS: Spearman rank korrelációs koefficiens

13. táblázat. A proteolyticus enzimek és a CEA, CA 19-9 szérum/plazma antigén koncentrációinak egymás közötti összefüggése colorectalis carcinomában (n=56)

4.2.1.6. A szérum/plazma proteáz koncentrációk prognosztikai szerepe

A betegeket követéses program (follow-up) során ellenőriztük. A követés során 35 beteg (62.5%) halt meg a CRC-vel összefüggésben (átlagos túlélés 32 hónap, 95%CL: 23-38 hónap, 7-78 hónap között). A követés ideje alatt 21 beteg maradt életben (37.5%) (átlagos túlélés 86 hónap, 95%CL: 85-91 hónap, 76-96 hónap között). Az összes betegre (n=56) kivetített túlélés 45 hónap volt (95%CL: 43-61 hónap, 7-96 hónap között). A kuratív resectián átesett daganatos betegek (Dukes A-C) átlagos túlélése (77 hónap, 95%CL: 56-73 hónap, 7-96 hónap között) szignifikánsan jobb volt, mint az inoperábilis Dukes D betegek átlagos túlélése (14 hónap, 95%CL: 11-19 hónap, 8-36 hónap között; $P<0.001$).

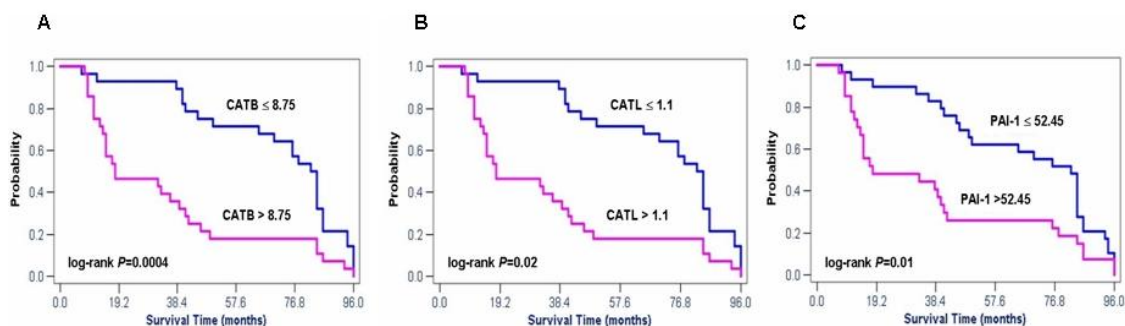
A túlélési vizsgálat során a proteolyticus enzimek és a CEA, CA 19-9 CRC-ben mért középértékeit tekintettük cut-off értékeknek (CATB: 8.75 ng/ml; CATL: 1.1 ng/ml; uPA: 0.29 ng/ml; PAI-1: 52.45 ng/ml; CEA: 2.40 ng/ml; CA 19-9: 9.15 ng/ml).

Az univariáns túlélési elemzés során az alábbi paraméterek esetében találtunk szignifikáns összefüggéseket a túléléssel:

- CATB szérum antigén koncentrációk ($P=0.0004$) (6. A. ábra);
- CATL szérum antigén koncentrációk ($P=0.02$) (6. B. ábra);
- PAI-1 plazma antigén koncentrációk ($P=0.01$) (6. C. ábra);
- CA 19-9 szérum koncentrációk ($P=0.004$)
- Dukes osztályozás ($P<0.0001$).

Az uPA és a CEA koncentrációk, a daganatos differenciáció (grading), a daganat lokalizáció, az életkor, a nem esetében nem találtunk szignifikáns korrelációt a túléléssel.

A független prognosztikai tényezők meghatározása céljából multivariáns analízist végeztünk. A multivariáns elemzés során csak azokat a tényezőket vettük figyelembe, amelyek az univariáns elemzés során szignifikánsak voltak a túlélés szempontjából ($P<0.05$). Ennek megfelelően a multivariáns elemzésben a Dukes osztályozást, valamint a PAI-1, CATB, CATL és CA 19-9 koncentrációkat értékeltük. A multivariáns elemzés értelmében független prognosztikai tényezőnek bizonyult a Dukes osztályozás ($P=0.004$), a PAI-1 ($P=0.001$), a CATB ($P=0.04$) és a CA 19-9 ($P=0.02$). A Cox-modellben folytonos tényezőkként vizsgálva, a PAI-1 (Hazard ratio, HR 2.22, $P=0.001$), a CATB (HR 2.09, $P=0.04$) és a CA 19-9 (HR 1.98, $P=0.02$) Dukes-független prognosztikai tényezőknek bizonyultak (14. táblázat).



6. ábra. Túlélési görbék a CATB, a CATL és a PAI-1 antigén koncentrációk függvényében colorectalis carcinomában (n=56)

A CATB, CATL és PAI-1 középértékei alapján a betegeket két csoportba osztottuk. A nagyobb értékek esetén a betegek túlélése rövidebb volt. A csoportok túlélési görbéit Kaplan-Meier módszerrel határoztuk meg. A *P* értékeket az ábrák tartalmazzák.

A. CATB szérumban antigén koncentrációk CRC-ben (CATB cut off = középérték: 8.75 ng/ml).

B. CATL szérumban antigén koncentrációk CRC-ben (CATL cut-off = középérték: 1.1 ng/ml).

C. PAI-1 plazma antigén koncentrációk CRC-ben (PAI-1 cut-off = középérték: 52.45 ng/ml).

	Univariáns analízis	Multivariáns analízis		
	Log-Rank test	Cox Proportional Hazards Model		
Tényező	<i>P</i> érték	<i>P</i> érték	HR	(95% CL)
Dukes	<0.0001	0.004	1.88	(1.22-2.89)
PAI-1	0.012	0.001	2.22	(1.21-4.06)
CATB	0.0004	0.042	2.09	(1.02-4.26)
CATL	0.021	0.639	1.17	(0.60-2.29)
CA 19-9	0.004	0.024	1.98	(1.09-3.58)
uPA	0.369			
CEA	0.159			
Grade	0.420			
Lokalizáció	0.566			
Életkor	0.247			
Nem	0.122			

Rövidítések: Dukes: Dukes osztályozás; CATB: cathepsin B; CATL: cathepsin L; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator, PAI-1: 1-es típusú plasminogén activator inhibitor; CEA: carcino-embriónális antigén; CA 19-9: carcinoma-asszociált carbhidrát antigén; Grade: daganatos differenciáció; Lokalizáció: daganat elhelyezkedés; HR: Hazard ratio; 95% CL: 95% Hazard ratio konfidencia határok

14. táblázat. A betegek univariáns és multivariáns túlélési elemzése colorectalis carcinomában (n=56)

4.2.1.7. Megbeszélés

A fejlett nyugati világban a CRC a leggyakoribb emésztőszervi daganat és a második daganatos halálok (158, 159).

Az emésztőszervi daganatok esetében a CEA és a CA 19-9 a leggyakrabban alkalmazott tumor márkerek. Mindkét antigén megtalálható az emésztőszervi daganatos szövetekben valamint a betegek szérumában (160-165).

A tumor márkerekkel szemben a prognózis előrejelzése is fontos elvárás. Mindkét márkert (CEA, CA 19-9) emelkedett koncentrációja összefügghet a CRC rossz prognózisával (166-171). Mivel azonban a preoperatív CEA és CA 19-9 szenzitivitása, specificitása nem megfelelő, tumor márkert szerepük korlátozott és nem alkalmasak a CRC szűrésére (165, 172, 173). Ezért a gastroenterológiai gyakorlatban nagy szükség lenne újabb, hatékony tumor márkerek bevezetésére.

A proteolyticus enzimek esetleges tumor márkert szerepéről keveset tudunk: CRC-ben a CATB, uPA és PAI-1 szérum ill. plazma koncentrációit csak egymástól függetlenül vizsgálták (39-43).

Mivel nincs irodalmi adat a cathepsinek és az uPA/PAI-1 rendszer lehetséges tumor márkert és prognosztikai szerepének összehasonlító vizsgálatára, egyazon CRC beteganyagban a CATB, CATL, uPA és PAI-1 viselkedését összevetettük a CEA és a CA 19-9 koncentrációk változásával (174).

Eredményeink megerősítik a korábbi észrevételeket, miszerint a preoperatív szérum CATB (39, 41, 43), valamint a plazma uPA (40) és PAI-1 (42) koncentrációk szignifikánsan nagyobbak a CRC betegek vármintáiban, mint a kontroll daganatmentes csoportban. A cathepsinokkal kapcsolatban bebizonyítottuk, hogy a CATB mellett a szérum CATL is szignifikánsan megemelkedik a CRC betegekben. Kiemelendő, hogy beteganyagunkban a CEA és a CA 19-9 esetében nem volt szignifikáns különbség a CRC és a kontroll csoportok között.

Elsőként igazoltuk, hogy a szérum CATB, CATL és a plazma PAI-1 antigén koncentrációk szignifikánsan megemelkednek a colorectalis adenomás betegek perifériás vármintáiban a kontroll csoporthoz képest. A vármintákból származó eredményeink megerősítik a korábbi, colorectalis szöveti mintákban igazolt adatokat (27, 30, 175), miszerint a proteolyticus enzimek a rákmegelőző colorectalis adenomák malignus transzformációjában is szerepet játszhatnak.

A proteolyticus enzimek tumor márkert szerepének tanulmányozása során azt találtuk, hogy a diagnózis felállításának pillanatában a PAI-1, a CATB, az uPA és a CATL

szenzitivitása jobban jelezte a CRC jelenlétét, mint a CEA vagy a CA 19-9 szenzitivitása. Vizsgálatunkban a CATB és a PAI-1 specificitása azonos tartományban mozgott a CEA és a CA 19-9 specificitásával. A PAI-1, CATB, és az uPA diagnosztikus hatékonysága meghaladta a CEA vagy a CA 19-9 hatékonyságát, e téren a PAI-1 diagnosztikus értéke volt a legmagasabb.

Jóllehet elsősorban költséghatékonysági szempontok miatt vitatott a többszörös (multiparametrikus) tumor márkerek elemzés, a módszer növelheti a daganatok felismerésének esélyét és a követés hatékonyságát. CRC beteganyagunkban a multiparametrikus megközelítés növelte a szenzitivitást. A PAI-1 és CATB, vagy a PAI-1 és uPA kombinációk szenzitivitása meghaladta az összes többi lehetséges kombináció szenzitivitását. A CEA vagy a CA 19-9 és egy proteolyticus enzim szenzitivitásának kombinációja meghaladta a CEA vagy a CA 19-9 önálló szenzitivitását. A többtényezős tumor márkerek elemzés során a két márkerek egyidejű kombinációja a specificitást is növelte.

A klasszikus prognosztikai tényezőként alkalmazott Dukes osztályozással történt összevetés során azt igazoltuk, hogy a CATB, a PAI-1, a CEA és a CA 19-9 szignifikánsan összefüggtek az előrehaladott Dukes stádiumokkal.

Korábbi vizsgálatok már igazolták, hogy a preoperatív szérumban CEA és CA 19-9 koncentrációk összefüggést mutathatnak a CRC-függő túléléssel (139, 166, 167, 168, 171). Egymástól független vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az emelkedett szérumban CATB (39, 41, 43) és plazma PAI-1 (42) koncentrációk CRC-ben összefüggnek a rövidebb túléléssel. Saját vizsgálatunkban, amelyben egyidejűleg és egyazon vérmintákban tanulmányoztuk a cathepsinek és a PAI-1, valamint a CEA és a CA 19-9 prognosztikai szerepét, az univariáns túlélési elemzés során a CATB és PAI-1 mellett a CATL is szignifikánsan összefüggött a túléléssel. A multivariáns túlélési elemzés során a CATB és a PAI-1 független prognosztikai tényezőnek bizonyultak. Vizsgálatsorozatunkban az ismert tumor márkerek közül csak a CA 19-9 mutatott összefüggést a túléléssel, a többtényezős elemzés során a CATB és PAI-1 mellett a CA 19-9 is független prognosztikai tényezőnek bizonyult. Fenti eredményeink teljes összhangban vannak a tumor márkerekkel kapcsolatos legújabb irányelvekkel. Ezen irányelvek értelmében a nem megfelelő szenzitivitás nagymértékben csökkenti a CEA diagnosztikus értékét CRC-ben, ezért a CEA a CRC szűrésére nem alkalmas. Nincs elég adat arra vonatkozóan sem, hogy a CEA értékek befolyásolnák az adjuváns kemoterápia indikációját. Ezzel szemben a szisztémás kezelés során a CEA

hatékonyan alkalmazható az áttétes CRC betegek monitorozására. Annak ellenére, hogy a preoperatív CA 19-9 összefügghet a prognózissal, a nemzetközi irányelvek alapján a CA 19-9 nem javasolható a CRC betegek szűrésére, de a diagnózis felállítására, követésére, vagy a betegek szisztémás kezelésének monitorozására sem alkalmas (176-178).

Eredményeink felvetik a rutinszerűen használt CEA és CA 19-9 márkerek mellett a proteolyticus enzimek (CATB, CATL, uPA, PAI-1) klinikai gyakorlatban történő alkalmazhatóságát. A proteázok érzékenyebben jelezték a CRC diagnózist, mint a CEA vagy a CA 19-9. Bár a többszörös tumor márkerek elemzése költséges és körülményes, vizsgálatunk során észlelt magas szenzitivitás és specificitás értékek arra utalnak, hogy ez a módszer hasznosítható lehet CRC-ben. Végül, eredményeink értelmében a szérumban CATB, CATL és plazmában PAI-1 antigén koncentrációk a CRC fontos prognosztikai tényezőinek tekinthetők.

4.2.2. Proteázok tumor márkerek szerepe egyéb emésztőszervi daganatokban

4.2.2.1. Szérumban CATB és plazmában uPA koncentrációk emésztőszervi daganatokban

Egy másik vizsgálatsorozatban a CATB és az uPA tumor márkerek viselkedését CRC mellett egyéb GI daganatokban (gyomorrák-GC, hepatocellularis carcinoma-HCC, és pancreas carcinoma-PC) is tanulmányoztuk. A szérumban CATB és plazmában uPA antigén koncentrációkat a GI daganatos csoportban (n=145) (GC, CRC, HCC, PC) és a kontroll csoportban (n=44) a 15. táblázat foglalja össze. Szignifikánsan nagyobb szérumban CATB és plazmában uPA antigén koncentrációkat mértünk a GI csoportban együttesen a kontroll csoporthoz képest. Amikor a GI daganatokat külön-külön vizsgáltuk, a CATB és az uPA antigén koncentrációk ezúttal is szignifikánsan nagyobbak voltak az egyes GI daganatok esetében, mint a kontroll csoportban.

	CATB	uPA
GI daganatok (n=145)	12.65±8.80	0.41±0.35
CRC (n=72)	13.38±10.39	0.33±0.28
GC (n=30)	9.00±4.07	0.32±0.16
HCC (n=28)	13.46±7.88	0.65±0.39
PC (n=15)	14.96±7.62	0.52±0.59
Kontroll (n=44)	3.67±0.79*	0.19±0.02*

Statisztika:

* Kontroll: $P < 0.001$ vs GI daganatok; $P < 0.001$ vs külön-külön CRC, GC, HCC és PC

Rövidítések: CATB: cathepsin B; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; GI daganatok: gastrointestinalis daganatok együttesen; CRC: colorectalis carcinoma; GC: gyomorrák; HCC: hepatocellularis carcinoma; PC: pancreas carcinoma; Kontroll: daganatmentes kontroll csoport

15. táblázat. A szérumban CATB és a plazmában uPA antigén koncentrációi emésztőszervi daganatokban és kontroll csoportban (ng/ml) (átlag ± SD)

4.2.2.2. Szérumban CATB és plazmában uPA koncentrációk diagnosztikus hatékonysága emésztőszervi daganatokban

A GI daganatokban a proteázok lehetséges tumor márkervizsgálata során a ROC görbék és a Youden J teszt segítségével meghatároztuk az optimális cut-off értékeket: a CATB optimális cut-off értéke 4.5 ng/ml-nek (Youden J=0.67), az uPA optimális cut-off értéke pedig 0.21 ng/ml-nek (Youden J=0.36) bizonyult.

A szérumban CATB és a plazmában uPA szenzitivitását és specificitását a GI daganatokban a 16. táblázat tartalmazza. Amikor a GI daganatokat együttesen vizsgáltuk, a CATB szenzitivitása, specificitása és diagnosztikus hatékonysága (89%, 86% ill. 89%) meghaladta az uPA értékeit (76%, 70% ill. 74%). A CATB esetén a PPV (95%) és az NPV (72%) értékek szintén nagyobbak voltak, mint az uPA esetében (89%, ill. 47%).

Ha az egyes GI daganatokat külön-külön tanulmányoztuk, a CATB szenzitivitása és diagnosztikus hatékonysága mindegyik vizsgált emésztőszervi daganat esetében nagyobb volt, mint az uPA esetében. A legmagasabb szenzitivitást és diagnosztikus hatékonyságot PC és CRC esetében észleltünk.

	Összes		CRC		GC		HCC		PC	
	CATB	uPA	CATB	uPA	CATB	uPA	CATB	uPA	CATB	uPA
Szenzitivitás	89	76	91	73	86	70	86	86	93	80
Specificitás	86	70								
PPV	95	89	91	80	81	62	80	65	70	48
NPV	72	47	86	62	90	77	90	88	97	91
Hatékonyság	89	74	89	72	86	70	86	76	88	73

Rövidítések: CATB: cathepsin B; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; Összes: összes gastrointestinalis daganat együttvéve; CRC: colorectalis carcinoma; GC: gyomorrák; HCC: hepatocellularis carcinoma; PC: pancreas carcinoma; Kontroll: daganatmentes kontroll csoport; PPV: Pozitív prediktív érték; NPV: Negatív prediktív érték; Hatékonyság: diagnosztikus hatékonyság

16. táblázat. A szérum CATB és a plazma uPA diagnosztikus hatékonysága emésztőszervi daganatokban (CATB cut-off: 4.5 ng/ml; uPA cut-off: 0.21 ng/ml)

4.2.2.3. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk emésztőszervi daganatokban az áttétek függvényében

A szérum CATB és a plazma uPA antigén koncentrációk szignifikánsan nagyobbak voltak az áttétes GI daganatos betegekben, mint a metastasis nélküli betegekben (17. táblázat).

		CATB	UPA
GI	Metasztázis + (n=92)	15.44±9.01*	0.48 ± 0.41*
	Metasztázis - (n=53)	7.82±5.92	0.29 ± 0.16
CRC	Metasztázis + (n=46)	16.68 ± 10.47*	0.37 ± 0.33#
	Metasztázis - (n=26)	7.55 ± 7.33	0.28 ± 0.16
GC	Metasztázis + (n=19)	10.49 ± 4.04**	0.36 ± 0.18#
	Metasztázis - (n=11)	6.43 ± 2.70	0.23 ± 0.11
HCC	Metasztázis + (n=17)	15.80 ± 8.43#	0.83 ± 0.39**
	Metasztázis - (n=11)	9.83 ± 5.47	0.36 ± 0.19
PC	Metasztázis + (n=10)	18.50 ± 6.63**	0.64 ± 0.49#
	Metasztázis - (n=5)	7.88 ± 3.20	0.28 ± 0.15

Statisztika:

* $P < 0.001$ vs Metasztázis -; ** $P < 0.005$ vs Metasztázis -; # $P < 0.05$ vs Metasztázis -

Rövidítések: Metasztázis+: áttétek jelenléte; Metasztázis-: nincs áttét; GI: gastrointestinalis daganatok együttesen; CRC: colorectalis carcinoma; GC: gyomorrák; HCC: hepatocellularis carcinoma; PC: pancreas carcinoma; Kontroll: daganatmentes kontroll csoport

17. táblázat. A szérumban CATB és a plazma uPA antigén koncentrációk emésztőszervi daganatos betegekben az áttétek függvényében (ng/ml) (átlag ± SD)

4.2.2.4. Szérumban CATB és plazma uPA koncentrációk emésztőszervi rákmegelőző állapotokban

A GI rákmegelőző állapotokat illetően szignifikánsan nagyobb szérumban CATB és a plazma uPA antigén koncentrációkat mértünk GED és colorectalis adenoma jelenlétében, mint a kontroll csoportban. A CATB és az uPA értékek szignifikánsan nagyobbak voltak a GC betegekben, mint GED-ben, ill. a CATB szignifikánsan nagyobb volt CRC-ben, mint a colorectalis adenomás betegekben (18. és 19. táblázatok). A colorectalis adenomás betegek vizsgálatakor szignifikánsan nagyobb szérumban CATB és plazma uPA koncentrációkat mértünk a tubulovillosus adenoma+HGD csoportban (n=14) a tubularis adenoma+LGD csoporthoz (n=16) képest (CATB: 6.53 ± 2.12 vs 4.86 ± 1.34 , $P=0.01$; uPA: 0.30 ± 0.1 vs 0.21 ± 0.03 , $P=0.01$).

	CATB	uPA
GC (n=30)	9.00±4.07#	0.32±0.16#
GED (n=25)	5.94±1.42	0.23±0.07
Kontroll (n=44)	3.67±0.79*	0.19±0.02*
ANOVA one-way	$P<0.0001$	$P<0.0001$

Statisztika:

* Kontroll: $P<0.001$ vs GC és GED

GC: $P<0.01$ vs GED

Rövidítések: CATB: cathepsin B; UPA: urokinase-típusú plasminogén activator; GC: gyomorrák; GED: gastro-epitheliális dysplasia; Kontroll: kontroll csoport

18. táblázat. Szérum CATB és plazma uPA antigén koncentrációk gyomorrákban, dysplasiában és kontroll egyéneknél (ng/ml) (átlag ± SD)

	CATB	uPA
CRC (n=72)	13.38±10.39#	0.33±0.28
Adenoma (n=30)	5.65±1.91	0.28±0.13
Kontroll (n=44)	3.67±0.79*	0.19±0.02*
ANOVA one-way	$P<0.0001$	$P<0.0001$

Statisztika:

* Kontroll: $P<0.001$ vs CRC és Adenoma

CRC: $P<0.001$ vs Adenoma

Rövidítések: CATB: cathepsin B; UPA: urokinase-típusú plasminogén activator; CRC: colorectalis carcinoma; Adenoma: colorectalis adenoma; Kontroll: kontroll csoport

19. táblázat. Szérum CATB és plazma uPA antigén koncentrációk colorectalis carcinomában, colorectalis adenomában és kontroll egyéneknél (ng/ml) (átlag ± SD)

4.2.2.5. Szérum CATB és plazma uPA koncentrációk korrelációja emésztőszervi daganatokban és rákmegelőző állapotokban

A GI daganatos és precancerosus laesiókkal rendelkező betegek perifériás vérmintáiban a szérum CATB és a plazma uPA antigén koncentrációk korrelációját a 20. táblázat foglalja össze. Standard lineáris regressziós elemzés során a CATB és az uPA koncentrációi a GI daganatokban és a rákmegelőző állapotokban egyaránt szignifikánsan korreláltak egymással.

	CATB/uPA	
	<i>P</i> érték, (korrelációs koefficiens)	
GI daganatok (n=145)	<i>P</i> =0.002	(r=0.24)
CRC (n=72)	<i>P</i> =0.02	(r=0.25)
GC (n=30)	<i>P</i> =0.04	(r=0.35)
HCC (n=28)	<i>P</i> =0.03	(r=0.39)
PC (n=15)	<i>P</i> =0.0004	(r=0.79)
GED (n=25)	<i>P</i> =0.0002	(r=0.67)
Adenoma (n=30)	<i>P</i> =0.0001	(r=0.67)

Rövidítések: CATB: cathepsin B; uPA: urokinase-típusú plasminogén activator; GI daganatok: gastrointestinális daganatok együttvéve; CRC: colorectalis carcinoma; GC: gyomorrák; HCC: hepatocellularis carcinoma; PC: pancreas carcinoma; GED: gastro-epitheliális dysplasia; Adenoma: colorectalis adenoma; r: korrelációs koefficiens

20. táblázat. A szérum CATB és a plazma uPA koncentrációk egymás közötti összefüggése emésztőszervi daganatokban és rákmegelőző állapotokban

4.2.2.6. Megbeszélés

Korábban emelkedett szérum CATB koncentrációkat igazoltak CRC (39, 41, 43), GC (179), PC (180) és HCC betegeknél (181); az uPA esetében pedig emelkedett plazma koncentrációkat mértek CRC (40) és HCC (182) betegeknél.

Mivel nincs irodalmi adat a cisztein proteáz CATB és a szerin proteáz uPA egyidejű viselkedéséről különböző GI daganatokban, ebben a vizsgálat sorozatban a szérum

CATB és a plazma uPA egyidejű klinikai viselkedését tanulmányoztuk CRC, GC, HCC és PC betegekben, valamint rákmegelőző állapotokban (183, 184).

Igazoltuk, hogy a preoperatív szérumban CATB és a plazma uPA koncentrációk szignifikánsan magasabbak a GI daganatokban, mint a daganatmentes kontroll csoportban. Eredményünk alátámasztja a két proteolyticus enzimrendszer szerepét a GI daganatok biológiájában.

Megerősítettük a korábbi megfigyeléseket, miszerint a szérumban CATB koncentrációk megemelkednek CRC, GC, PC és HCC betegekben (39, 41, 43, 179, 180, 181); ill. a plazma uPA koncentrációk CRC és HCC betegekben (40, 182). Új eredmények számít, hogy a plazma uPA GC és PC betegekben is megemelkedik, továbbá HCC betegekben a plazma uPA mellett emelkedett szérumban CATB koncentrációk is igazolhatók.

Egyéb daganatokban (pl. emlő-, tüdő, ovarium-, prostata rákban) korábban már igazolták a PA rendszer lehetséges tumor márkert jelentőségét (185-189).

Az emésztőrendszeri daganatok esetében a proteolyticus enzimek esetleges tumor márkert szerepéről keveset tudunk: korábban CRC-ben a szérumban CATB és az uPA/PAI-1 plazma koncentrációkat csak egymástól függetlenül vizsgálták (39-43).

A CATB és az uPA egyazon perifériás vérmintában történő vizsgálatok azt találtuk, hogy a szérumban CATB és a plazma uPA koncentrációk több GI daganatban is érzékeny tumor márkertként viselkednek. A CATB szenzitivitása, specificitása, PPV és NPV értéke, valamint diagnosztikus hatékonysága jobb volt, mint az uPA hasonló értékei. Ha a GI daganatokat külön-külön elemeztük, a CATB diagnosztikus hatékonysága meghaladta az uPA hatékonyságát; a legmagasabb szenzitivitást és diagnosztikus hatékonyságot PC és CRC esetében igazoltuk. A CATB tumor márkert viselkedése az összes vizsgált GI daganat esetében kimagasló (85% feletti) volt. Ezzel szemben az uPA szenzitivitása elsősorban HCC (86%) és PC (80%) esetében elfogadható, míg CRC (73%) és GC (70%) esetében a szenzitivitás alacsonyabbnak bizonyult. A CATB (95%) és az uPA (89%) magas PPV értéke is arra utalhat, hogy GI daganat gyanújakor a két proteolyticus enzim vizsgálata hasznos lehet a klinikai gyakorlatban.

Az áttéteket adó GI daganatos betegek perifériás vérmintáiban mért nagyobb CATB és uPA koncentrációk megerősítik a korábbi, szöveti mintákban igazolt eredményeket, miszerint ezek a proteázok fontos szerepet játszanak a GI daganatok progressziójában. Előzőekben részletezett tanulmányunk mellett (174), ebben a vizsgálatosorozatban is igazoltuk, hogy a szérumban CATB antigén koncentrációja szignifikánsan megemelkedik

a colorectalis adenomás betegek vérmintáiban a kontroll csoporthoz képest. Azt is kimutattuk, hogy a CATB és az uPA koncentrációk szignifikánsan nagyobbak voltak tubulovillosus adenoma és HGD esetében a tubularis adenoma és LGD csoporthoz képest. A perifériás vérmintákból származó eredményeink megerősítik a korábbi, colorectalis szöveti mintákban igazolt adatokat (27, 30, 175), miszerint a cisztein és szerin proteázok a colorectalis adenomák malignus transzformációjában is szerepet játszhatnak.

A rákmegelőző állapotok vizsgálatakor további új eredmény, hogy a GED esetében szignifikánsan nagyobbak a szérum CATB és plazma uPA koncentrációk, mint a kontroll csoportban, alátámasztva a korábbi, gyomorszövetben igazolt adatainkat (22). Eredményeink jól illeszthetők Correa többtényezős, többlépcsős gyomor carcinogenesis modelljébe, amelynek értelmében a chronicus gastritis, chronicus atrophias gastritis, intestinalis metaplasia és a GED megelőzik a gyomorrák kialakulását (23, 24).

Elsőként igazoltuk, hogy a szérum CATB és a plazma uPA koncentrációk szignifikáns összefüggést mutatnak GI daganatokban. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy a két proteolyticus enzimrendszer egyidejűleg aktiválódik a daganatok biológiájában. A GI rákmegelőző eltérések jelenlétében észlelt szoros összefüggés pedig arra utal, hogy a vizsgált proteolyticus enzimek a GI daganatok inváziója mellett a precancerous laesiók malignus transzformációjában és progressziójában is szerepet játszhatnak.

Eredményeinknek a GI daganatok megelőzésében is szerepe lehet. A GI daganatok esetében a primaer prophylaxis és a kemoprophyllaxis mellett a daganatok megelőzésében döntő szerepe van a másodlagos (secundaer) prevenciónak. Secundaer prophylaxis alatt a precancerous állapotok progressziójának és malignus transzformációjának megelőzését értjük (190-193). A szérum ill. plazma proteázok mérése a rákmegelőző laesiók esetében hozzásegíthet a valóban nagykockázatú betegek azonosításához. Az időben történő endoscopos polypectomia és a szakszerű endoszkópos követés mellett (194-200), a proteolyticus enzimek meghatározása is része lehet a GI daganatok megelőző stratégiáinak.

4.3. Az MMP-9 expressziója CRC-ben

4.3.1. MMP-9 immunhisztokémiai expressziója az ép nyálkahártya-colorectalis adenoma-dysplasia-CRC szekvenciában

Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziójának score-értékeit egészséges vastagbél nyálkahártyában (n=31), colorectalis adenomában (n=30) és CRC-ben (n=31) a 21. táblázat tartalmazza.

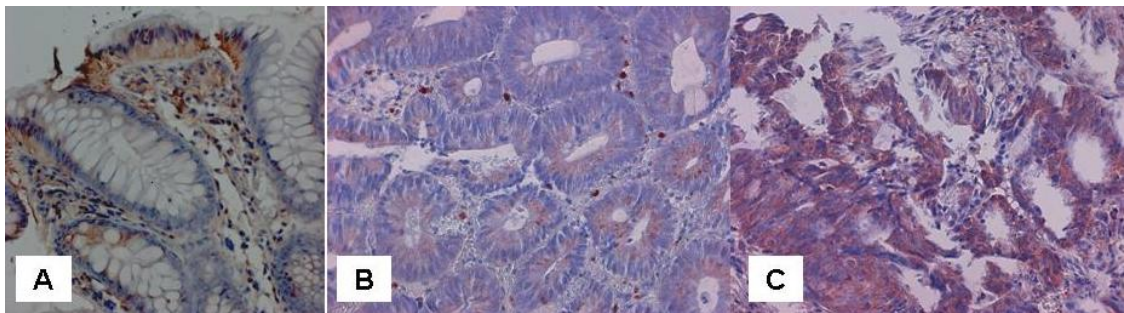
Az MMP-9 immunhisztokémiai szemikvantitatív pontértéke CRC-ben szignifikánsan nagyobb volt, mint colorectalis adenomában vagy az egészséges nyálkahártyában. Az MMP-9 expressió nagyobb volt adenomákban, mint az egészséges nyálkahártyában, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. A tubulovillosus+HGD adenomás csoportban (n=9) szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót találtunk, mint a többi adenomában (n=21; tubularis és tubulovillosus adenoma+LGD; 1.83 ± 0.27 vs 0.38 ± 0.08 , $P < 0.001$), vagy az ép nyálkahártyában (1.83 ± 0.27 vs 0.46 ± 0.12 , $P < 0.001$).

Szövettan	Score (átlag \pm SEM)
Normális colon (n=31)	0.46 ± 0.12
Adenoma (n=30)	0.81 ± 0.15
CRC (n=31)	1.98 ± 0.13
ANOVA one-way	$P < 0.0001$

Rövidítések: MMP-9: mátrix metalloproteináz-9; Normális colon: egészséges vastagbél nyálkahártya; Adenoma: colorectalis adenoma; CRC: colorectalis carcinoma; Score: szemikvantitatív pontérték; SEM: standard error of mean

21. táblázat. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója egészséges vastagbél nyálkahártyában, adenomában és colorectalis carcinomában (átlag \pm SEM)

Az egészséges vastagbél nyálkahártya hámrétegében csak kevés crypta hámsejt esetében (elsősorban a lumenális felszínen) lehetett MMP-9 expressziót észlelni. A lamina propriában néhány polymorphonucleáris leukocita (PMNL) és myofibroblast mutatott diffúz citoplazmatikus festődést (7a. ábra). Adenomákban a legtöbb dysplasiás hámsejt esetében közepesen intenzív citoplazmatikus MMP-9 expresszió igazolódott; egyértelműen el lehetett különíteni a dysplasiás és nem-dysplasiás területeket (7b. ábra). CRC esetében a daganatos sejtek és a stromális sejtek egyaránt diffúzan erős MMP-9 expressziót mutattak. Az adenocarcinomás sejtekben az MMP-9 elsősorban a citoplazmában és a lumenális hámsejtek citoplazmatikus membránjában expresszáldott. A környező lamina propriában számos MMP-9 pozitív leukocita és myofibroblast igazolódott (7c. ábra).



7. ábra. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója vastagbélben

A. Normális, egészséges vastagbél nyálkahártya

B. Colorectalis adenoma alacsony fokú dysplasiával (LGD)

C. Colorectalis carcinoma

(MMP-9 –biotin-streptavidin-amino-etil-karbazol; hematoxin; 200x nagyítás).

A. Az egészséges vastagbél nyálkahártya hámrétegében csak kevés crypta hámsejt esetében van MMP-9 expresszió (elsősorban a lumenális felszínen). A lamina propriában néhány polymorphonucleáris leukocita (PMNL) és myofibroblast mutatott diffúz citoplazmatikus festődést.

B. Adenomában a legtöbb dysplasiás hámsejt közepesen intenzív citoplazmatikus MMP-9 expressziót mutat. A lamina propriában az MMP-9 pozitív sejtek aránya valamivel nagyobb, mint az egészséges nyálkahártyában.

C. Colorectalis carcinomában diffúzan erős MMP-9 expresszió a daganatos hámsejtekben. A környező lamina propriában számos MMP-9 pozitív leukocita és myofibroblast.

4.3.2. MMP-9 immunhisztokémiai expressziójának összefüggése a CRC differenciáltsági fokával és a Dukes stádiumokkal

Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója szignifikánsan nagyobb volt a közepesen (G2) és a rosszul differenciált daganatokban (G3) a jól differenciált (G1) CRC-hez képest (22. táblázat).

Az MMP-9 expresszió nagyobb volt a Dukes B, C és a D stádiumokban az A stádiumhoz képest, de a különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak (23. táblázat).

Differenciáció	Score (átlag ± SEM)
Jól differenciált (G1) (n=5)	1.30 ± 0.20
Közepesen differenciált (G2) (n=17)	2.11 ± 0.14
Roszul differenciált (G3) (n=9)	2.33 ± 0.28
Kruskall-Wallis variancia analízis	<i>P</i> =0.02

*Rövidítések:*MMP-9: mátrix metalloproteináz-9; Differenciáció: colorectalis carcinoma differenciáltsági foka; G1: jól differenciált colorectalis carcinoma; G2: közepesen differenciált colorectalis carcinoma; G3: rosszul differenciált colorectalis carcinoma; Score: szemikvantitatív pontérték; SEM: standard error of mean

22. táblázat. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója a colorectalis carcinoma differenciáltsági foka (grading) függvényében (n=31) (átlag ± SEM)

Stádium	Score (átlag ± SEM)
DUKES A (n=6)	1.58 ± 0.32
DUKES B (n=8)	2.25 ± 0.25
DUKES C (n=7)	1.85 ± 0.26
DUKES D (n=10)	2.00 ± 0.21
ANOVA one-way	<i>P</i> =NS

*Rövidítések:*MMP-9: mátrix metalloproteináz-9; Score: szemikvantitatív pontérték; DUKES A: Dukes A stádium; DUKES B: Dukes B stádium; DUKES C: Dukes C stádium; DUKES D: Dukes D stádium; NS=nem szignifikáns; SEM: standard error of mean

23. táblázat. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója a colorectalis carcinoma Dukes stádiumai függvényében (n=31) (átlag ± SEM)

4.3.3. Taqman RT-PCR CRC-ben

Az MMP-9 immunhisztokémiai eredmények megerősítésére Taqman RT-PCR elemzést végeztünk. CRC-ben az expressziós érték (EV) szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges vastagbél nyálkahártya esetében.

Colorectalis adenomákban az MMP-9 expresszió szintén nagyobb volt, mint az ép vastagbélben, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (24. táblázat).

A Taqman RT-PCR elemzés során a Dukes B stádium (EV: 27.634 ± 1.231) és a Dukes D stádium (EV: 27.289 ± 0.534) esetében egyaránt szignifikánsan nagyobb volt az MMP-9 expresszió, mint az egészséges vastagbél nyálkahártyában (EV: 26.112 ± 0.88 ; $P < 0.05$).

Szövettan	dCT	EV (45-dCT)
Normális colon (n=5)	18.888 ± 0.880	26.112 ± 0.88
Adenoma (n=13)	18.658 ± 0.985	26.342 ± 0.985
CRC (n=10) *	17.538 ± 0.882	27.462 ± 0.882

Statisztika:

Colorectal carcinoma: * $P < 0.05$ vs Normális colon

Rövidítések: Normális colon: egészséges vastagbél nyálkahártya; Adenoma: colorectalis adenoma; CRC: colorectalis carcinoma; dCT: delta CT értékek; EV: expressziós érték (teljes ciklus szám - dCT); SD: standard deviáció

24. táblázat. Az MMP-9 Taqman RT-PCR elemzése egészséges vastagbél nyálkahártyában, colorectalis adenomában és colorectalis carcinomában (dCT és expressziós értékek) (átlag \pm SD)

4.3.4. Megbeszélés

Korábban számos daganatban (pl. hólyag-, prostata-, tüdő-, emlőrákban) igazolták az MMP-k fokozott expresszióját (201-203).

Az MMP-k GI daganatokban is expresszálódnak (pl. nyelőcsőrák, GC, PC, HCC) (95, 96, 204-207).

CRC esetében kezdetben állatkísérletes modellekben, ill. sejt- és szövettényezeteken végzett vizsgálatok igazolták az MMP-k jelentőségét (208-210). Korábbi vizsgálatok CRC-ben az MMP-9 fokozott expresszióját is kimutatták (49-53).

Az MMP-9 expresszióját eddig még nem vizsgálták az ép vastagbél nyálkahártya - adenoma - dysplasia - CRC szekvenciában. Ezért ebben a szekvenciában az MMP-9 viselkedését immunhisztokémiai és TaqMan RT-PCR elemzés során tanulmányoztuk (211).

Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója szignifikánsan nagyobb volt a daganatos szövetben, mint a daganatmentes normális vastagbél nyálkahártyában, amely alátámasztja a korábbi eredményeket, miszerint CRC-ben fokozott az MMP-9 expressziója. Azt is megerősítettük, hogy CRC-ben a daganatos hámsejtek és a stromális sejtek egyaránt erős MMP-9 expressziót mutatnak (212-217).

Colorectalis adenomákban a legtöbb dysplasiás hámsejt közepesen intenzív citoplazmatikus MMP-9 expressziót mutat, és egyértelműen el lehetett különíteni a dysplasiás és dysplasia-mentes területeket. Ezzel szemben a normális vastagbél nyálkahártyában az MMP-9 fő lokalizációja a submucosa, ahol leukociták és myofibroblastok mutattak pozitív MMP-9 festődést.

Vizsgálatunkban az MMP-9 immunhisztokémiai expresszió intenzitása jól követte a vastagbél eltérések súlyosságát, vagyis a normális szövet - adenoma - dysplasia - CRC szekvenciát. A legalacsonyabb expressziót az egészséges vastagbél nyálkahártyában észleltük. Szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót találtunk colorectalis adenomák és egyidejű HGD esetében a normális nyálkahártyához képest. Végül CRC-ben az MMP-9 expressziója szignifikánsan nagyobb volt, mint az adenomákban. Eredményeink arra utalnak, hogy az MMP-9 fontos szerepet játszik a CRC kialakulásában és az invazivitás egyik márkerének tekinthető.

Az MMP-9 expresszió és daganat differenciáció (grading) összefüggéseit vizsgálva, a rosszul differenciált (G3) és a közepesen differenciált (G2) daganatokban szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót találtunk a jól differenciált (G1)

tumorokhoz képest, amely megerősíti, hogy az MMP-9 fontos tényező a CRC progressziójában.

Az immunhisztokémiai eredményeink megerősítésére és validálására független mintákban TaqMan RT-PCR elemzést végeztünk. Az RT-PCR vizsgálat során szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót lehetett igazolni a daganatos szövetben a normális szövethez képest, amely megerősíti az immunhisztokémiai adatokat. Az adenomák és a normális nyálkahártya összehasonlításakor viszont bizonyos ellentmondás mutatkozott az MMP-9 fehérje és az mRNS szintekben. A különbség részben a relatív kis esetszámokból adódik. Másrészt a két technika módszertanából is származhatnak eltérések. Míg az immunhisztokémiai vizsgálat lokalizáció-specifikus szemikvantitatív módszer, az RT-PCR technika alkalmazásakor az eredményeket a biopsziás minta összömege és az adenomatosus sejtek száma határozza meg. A fentiek részben magyarázatot adhatnak arra, hogy az RT-PCR módszer során az adenomákban mért nagyobb expresszió nem érte el a szignifikáns különbséget a normális nyálkahártyához képest; ezzel szemben szignifikánsan nagyobb MMP-9 immunhisztokémiai expressziót találtunk adenomákban az egészséges nyálkahártyához képest. Az adenoma/CRC szekvenciában észlelt MMP-9 fehérje és mRNS viselkedés közti különbségnek további biológiai magyarázata is lehet. A carcinogenesis korai fázisaiban számos epigenetikus mechanizmus (pl. DNS metiláció; K-ras proto-onkogén jelrendszer eltérése; APC metilációs státus) játszik szerepet (218-220). Az MMP-9 expresszióját a természetesen előforduló MMP szöveti inhibitorai (TIMP) is befolyásolják (221-223).

Egyes szerzők a fokozott MMP-9 expressziót a CRC rosszabb prognózisával is összefüggésbe hozták, mások szerint azonban az MMP-9 prognosztikai szerepe vitatott (54-57, 224). Vizsgálatunkban az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója a Dukes B, C és a D stádiumokban megemelkedett a Dukes A stádiumhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns.

Felvetették, hogy az MMP-9 meghatározása jól hasznosítható az adjuváns kemoterápia hatékonyságának lemerésében. Igazolták, hogy a kifejezett MMP-9 expressziót mutató CRC-s betegekben kevésbé hatékony az adjuváns kemoterápia és nagyobb a posztoperatív daganatos recidíva (225). Azt is kimutatták, hogy CRC-ben az 1-es típusú MMP-inhibitor (TIMP-1) koncentrációja szoros összefüggést mutat a kombinált kemoterápiára adott terápiás válasszal és az áttétes betegek túlélésével (226).

A colorectalis carcinogenesisben betöltött szerepe alapján az MMP-9 ideális célpont lehet a CRC modern daganatellenes kezelésében (227-233). A molekuláris támadáspontú gyógyszerek kifejlesztésekor az MMP-k aktivációjának gátlása megakadályozhatja a daganat lokális terjedését, az angiogenezist, valamint a távoli metastasis képződését. A szintetikus MMP inhibitorok között széles spektrumú és szelektív hatású vegyületek egyaránt ismertek. A kezdeti klinikai eredmények alapján úgy tűnik, hogy a szintetikus MMP-gátlók fontos kiegészítői lehetnek a CRC jelenlegi kemoterápiás kezelésének (234-236).

4.4. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 expressziója CU-ban

4.4.1. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója CU-ban

Az MMP-9 immunhisztokémiai expresszióját CU esetében (n=34) a hámrétegben, a lamina propria területén és a teljes nyálkahártyában, valamint a kontroll csoportot képező ép vastagbél nyálkahártyában (n=10) a 25. táblázat foglalja össze. Az MMP-9 expresszió a lamina propriában és a teljes nyálkahártyában a gyulladás súlyosságának mértékével együtt fokozódott, míg a hámrétegben szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót észleltünk a kontroll csoportban és enyhe gyulladásban, a közepes és súlyos gyulladáshoz képest.

Az MMP-9 elsősorban a citoplazmában és a lumenális hámsejtek citoplazmatikus membránjában expresszáldott. Fokozott pozitív expressziót PMNL-ekben is megfigyeltünk. A lamina propria területén az MMP-9 expressziója a gyulladás súlyosságával fokozódott. Elsősorban a gyulladt területeken, elvértve MMP-9 pozitív makrophag-sejteket is találtunk (8. ábra).

Szövettan	Hámréteg	Lamina propria	Teljes nyálkahártya
Kontroll (n=10)	22.39±4.98 ^a	6.25±2.56	17.45±3.99
Enyhe CU (n=11)	4.16±3.39 ^b	11.04±2.78	7.80±2.70
Közepes CU (n=11)	0.26 ± 0.59	23.96±3.67 ^e	21.68±5.91 ^h
Súlyos CU (n=12)	0.01 ± 0.03	52.63±3.94 ^{c, d}	52.66±3.94 ^{f, g}
ANOVA one-way	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Statisztika:

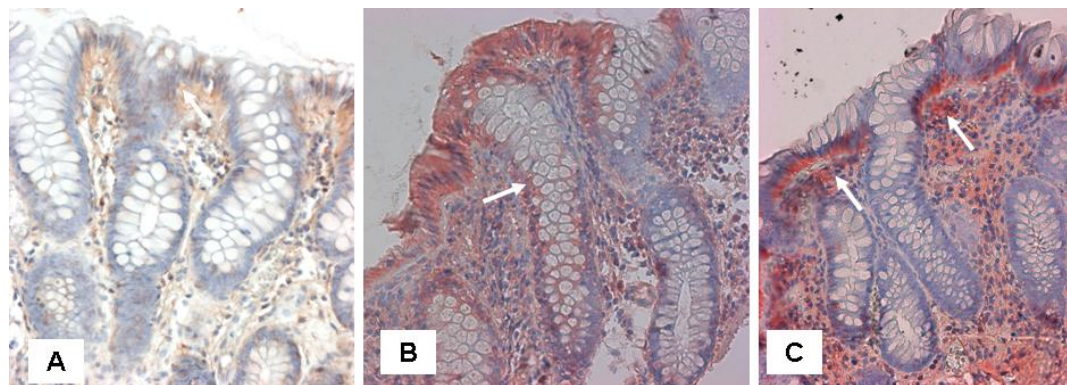
Hámréteg: ^a P <0.001 vs Közepes és Súlyos CU; ^b P <0.05 vs Közepes és Súlyos CU

Lamina propria: ^c P <0.001 vs Kontroll és Enyhe CU; ^d P <0.05 vs Közepes CU; ^e P <0.05 vs Kontroll

Teljes nyálkahártya: ^f P <0.001 vs Enyhe CU; ^g P <0.05 vs Kontroll; ^h P <0.05 vs Enyhe CU

Rövidítés: Kontroll: egészséges vastagbél nyálkahártya; CU: colitis ulcerosa

25. táblázat. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója ép vastagbél nyálkahártyában és colitis ulcerosában (festődési index, LI %); (átlag ± SD)



8. ábra. Az MMP-9 expressziója ép vastagbélben és colitis ulcerosában

(A: ép nyálkahártya; B: enyhe gyulladás; C: súlyos gyulladás)
(MMP-9-biotin-streptavidin-amino-etil-karbazol; hematoxin festés)

A. Az ép vastagbél hámrétegben MMP-9 pozitív festődés figyelhető meg a citoplazmában és a lumenális hámsejtek citoplazmatikus membránjában. Diffúz bazális immunreakció a cryptákban, gyér expresszió a lamina propriaiban (fehér nyíl) (300x nagyítás); **B.** Enyhe gyulladásban fokozottabb diffúz citoplazmatikus MMP-9 immunfestődés a crypták hámsejtjeiben, gyér MMP-9 expresszió a lamina propria lymphoid aggregátumaiban (fehér nyíl) (200x nagyítás); **C.** Súlyos gyulladásban a cryptákban alig van MMP-9 expresszió; a lamina propriaiban viszont kifejezett pozitív MMP-9 festődés látható a gyulladós sejtekben (fehér nyíl) (200x nagyítás)

4.4.2. A HGFR és az IGR-1 immunhisztokémiai expressziója CU-ban

A HGFR és az IGR-1 immunhisztokémiai expresszióját CU esetében (n=34) a hámrétegben, a lamina propria területén és a teljes nyálkahártyában, valamint a kontroll csoportban (n=10) a 26. és 27. táblázatok tartalmazzák.

A HGFR expressziója a teljes nyálkahártyában a gyulladás súlyosságával együtt fokozódott. Hasonló szignifikáns tendenciát lehetett megfigyelni a lamina propriában is. A HGFR hám-expressziója azonban szignifikánsan nagyobb volt enyhe gyulladásban a közepes és súlyos gyulladáshoz képest (26. táblázat).

Az egészséges vastagbél hámban lokalizáció-specifikus HGFR expressziót nem észleltünk. Csak elvétve találtunk néhány HGFR pozitív sejtet a cryptákban. Ugyanezt lehetett megfigyelni a közepes és súlyos gyulladás esetében is. Enyhe gyulladásban nagyobb számú HGFR-pozitív hámsejt igazolódott. A subepithelialis rétegben elvétve leukocytoid és plazmasejtszerű elemek diffúz citoplazmatikus immunreaktivitást mutattak. Ezek aránya a gyulladás súlyosságával párhuzamosan fokozódott (9. ábra).

Az IGR-1 hám-expressziója szignifikánsan csökkent súlyos UC-ban az enyhe és közepes gyulladáshoz képest. (27. táblázat). Az egészséges hámban közepesen intenzív bazális és diffúz citoplazmatikus hám expressziót találtunk a vastagbél crypták felső harmadában. Az immunreaktivitást mutató crypta-hámsejtek száma és az immunreakció intenzitása a gyulladás súlyosságával fokozódott. Közepes gyulladásban csaknem minden cryptában diffúz citoplazmatikus immunreaktivitást észleltünk. Súlyos gyulladásban azonban csak enyhe-közepes bazális IGR-1 pozitivitást lehetett látni néhány luminális hámsejtben. A lamina propria területén is csak nyomokban lehetett IGR-1 pozitív crypta hámsejteket találni (10. ábra).

Szövettan	Hámréteg	Lamina propria	Teljes nyálkahártya
Kontroll (n=10)	0.70 ± 0.37	6.27 ± 2.42	4.03± 2.15
Enyhe CU (n=11)	35.27 ± 10.22 ^{a, b}	6.86 ±1.94	9.21±5.19
Közepes CU (n=11)	5.80 ± 2.60	20.09 ±3.14 ^e	13.25±7.74 ^h
Súlyos CU (n=12)	5.90 ± 1.18 ^c	40.05±3.98 ^d	29.73±13.7 ^{f,g}
ANOVA one-way	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.001

Statisztika:

Hámréteg: ^a*P*<0.001 vs Kontroll; ^b*P*<0.05 vs Közepes és Súlyos CU; ^c*P*<0.05 vs Kontroll;
Lamina propria: ^d*P*<0.001 vs Kontroll és Enyhe CU; ^e*P*<0.05 vs Kontroll és Enyhe CU;
Teljes nyálkahártya: ^f*P*<0.001 vs Kontroll; ^g*P*<0.05 vs Enyhe CU; ^h*P*<0.05 vs Kontroll

Rövidítés: Kontroll: ép vastagbél nyálkahártya; CU: colitis ulcerosa

26. táblázat. A HGFR immunhisztokémiai expressziója ép vastagbél nyálkahártyában és colitis ulcerosában (festődési index, LI %) (átlag±SD)

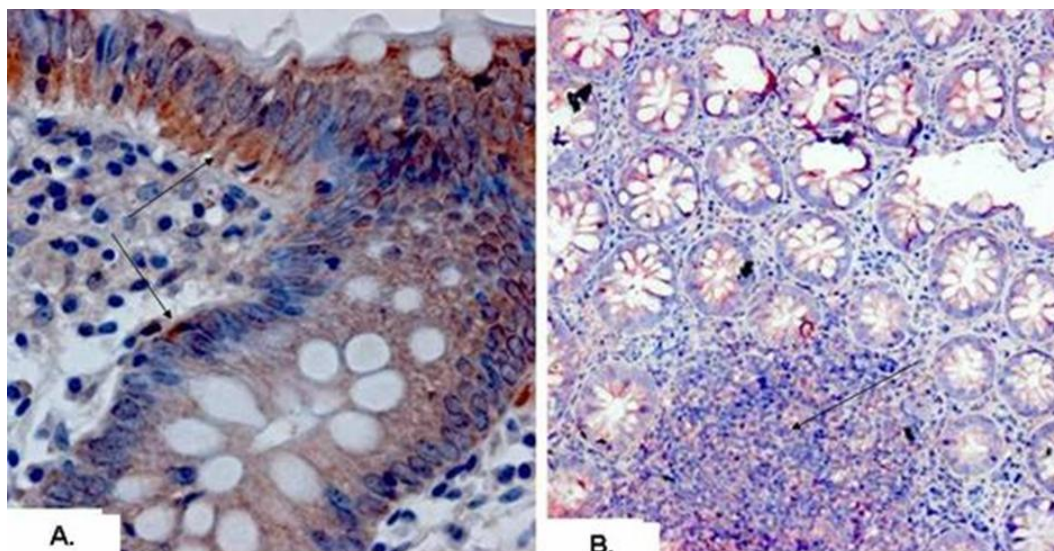
Szövettan	Hámréteg
Kontroll (n=10)	7.2 ± 3.15
Enyhe CU (n=11)	22.3 ± 9.46 ^a
Közepes CU (n=11)	50.2 ± 8.6 ^b
Súlyos CU (n=12)	6.4 ± 3.66
ANOVA one-way	<i>P</i> <0.005

Statisztika:

^a*P*<0.05 vs Kontroll és Súlyos CU; ^b*P*<0.005 vs Kontroll és Súlyos CU

Rövidítés: Kontroll: ép vastagbél nyálkahártya; CU: colitis ulcerosa

27. táblázat. Az IGFR-1 immunhisztokémiai expressziója ép vastagbél nyálkahártyában és colitis ulcerosában (festődési index, LI %) (átlag±SD)

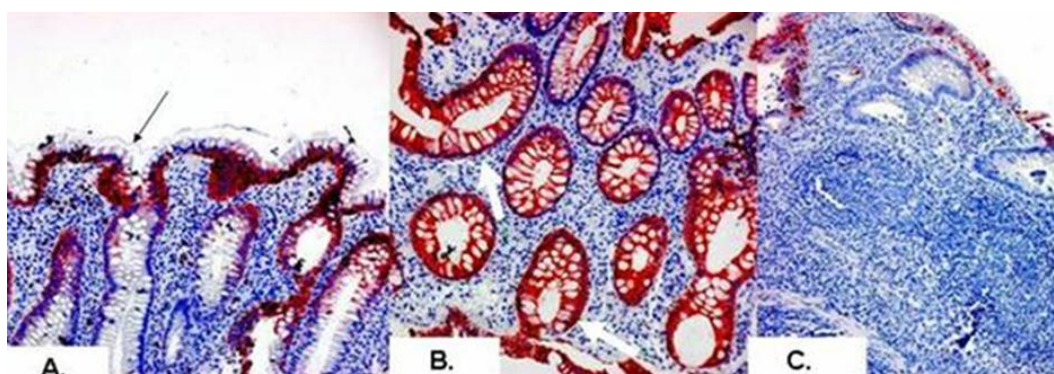


9. ábra. A HGFR expressziója colitis ulcerosában

(A: enyhe gyulladás; B: lymphoid aggregátum HGFR-pozitív sejtekkel)

(HGFR-biotin-streptavidin-amino-etil-karbazol; hematoxin festés)

A. Enyhe gyulladás: diffúz bazális és perinuclearis citoplazmatikus immunreaktivitás (fekete nyílak) (400x nagyítás); B. Subepitheliális lymphoid folliculus HGFR-pozitív sejtekkel. A HGFR-pozitív lymphoid folliculusok száma párhuzamosan nő a gyulladás súlyosságával (fekete nyíl) (200x nagyítás)



10. ábra. Az IGFR-1 expressziója colitis ulcerosában

(A: enyhe gyulladás; B: közepes gyulladás; C: súlyos gyulladás)

(IGFR-1-biotin-streptavidin-amino-etil-karbazol; hematoxin festés)

A. Enyhe gyulladás: bazális és diffúz citoplazmatikus hám-expresszió a vastagbél crypták felső harmadában (fekete nyíl) (200x nagyítás). B. Közepes gyulladás: diffúz citoplazmatikus immunreakció csaknem minden cryptában (fehér nyílak) (200x nagyítás). C. Súlyos gyulladás: csak néhány lumenális hámsejt esetében figyelhető meg enyhe-közepes bazális IGFR-1 pozitivitás (100x nagyítás).

4.4.3. Gén-expressziós elemzés CU-ban

Az MMP-9, HGFR és IGFR-1 gén-expressziós elemzése független mintákon történt. A gén-expressziós értékeket súlyos UC (n=12) és egészséges, normális kontroll csoportban (n=11) hasonlítottuk össze. Az MMP-9 expresszió szignifikánsan nagyobb volt súlyos UC esetében, mint a kontroll csoportban (10.69 ± 1.02 vs 7.15 ± 0.88 , $P < 0.001$). HGFR esetében is szignifikánsan nagyobb gén-expressziót találtunk súlyos UC-ban a kontroll csoporthoz képest (10.57 ± 0.57 vs 9.44 ± 0.35 , $P < 0.001$). IGFR-1 esetében súlyos CU-ban alacsonyabb volt az expresszió, mint a kontroll csoportban, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (8.03 ± 0.48 vs 8.77 ± 0.76 , $P = 0.07$).

4.4.4. Taqman RT-PCR CU-ban

Az immunhisztokémiai és a gén-expressziós eredmények megerősítésére MMP-9, HGFR és IGFR-1 TaqMan RT-PCR elemzést végeztünk. Az MMP-9 expressziója 3.62-szer nagyobb volt aktív CU esetében az ép vastagbélhez képest ($2^{(-\text{ddCt})}$: -3.616; $P < 0.05$). HGFR esetében aktív CU esetében 1.52-szer nagyobbak bizonyult az expresszió, mint az egészséges, ép vastagbélben ($2^{(-\text{ddCt})}$: 1.523; $P < 0.05$). Ezzel szemben az IGFR-1 expressziója 0.69-szer alacsonyabb volt aktív CU-ban, mint az ép vastagbélben ($2^{(-\text{ddCt})}$: 0.6853; $P < 0.05$).

4.4.5. Az MMP-9, HGFR és IGFR-1 expressziók közötti összefüggések

A nyálkahártya MMP-9 és HGFR expressziók szignifikáns összefüggést mutattak (korrelációs koefficiens, $r = 0.68$; $P = 0.001$). Az MMP-9 és az IGFR-1 expressziója között szignifikáns fordított korrelációt találtunk ($r = -0.35$; $P = 0.01$); a HGFR és az IGFR-1 expressziója között is fordított összefüggést figyeltünk meg, de ez nem bizonyult szignifikánsnak ($r = -0.26$, $P = 0.08$).

4.4.6. Korrelációs elemzés

MMP-9 esetében szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a kumulatív fehérje expressziós értékek (a crypta-hámrétegben és a lamina propriában együttvéve), valamint az ép és egészséges CU mintákban mért mRNS értékek között ($r > 0.95$). Az

MMP-9 fehérje expresszió a lamina propriában is szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az mRNS expressziós értékekkel az adott csoportokban ($r > 0.95$).

A HGFR expressziót illetően az mRNS expressziók egyaránt szignifikánsan korreláltak a crypta-hámrétegben ($r > 0.95$) és a lamina propriában mért fehérje expressziós értékekkel ($r > 0.95$).

Az IGFR-1 esetében a crypta-hámréteg fehérje expressziója szignifikáns korrelációt mutatott az mRNS értékekkel ($r > 0.95$). Mivel a lamina propriában alig volt IGFR-1 fehérje expresszió, a korrelációs elemzéstől ebben az esetben eltekintettünk.

4.4.7. Megbeszélés

A vastagbél nyálkahártya ismételt károsodása és sérülése fontos mozzanat az IBD kialakulásában. IBD-ben az ép vastagbél nyálkahártya - gyulladás - szöveti károsodás - gyógyulás szekvencia során fokozott bél nyálkahártya-turnover jellemző. IBD-ben gyulladáshoz vezető mediátorok, mint pl. proteolyticus enzimek, citokinek, növekedési faktorok vesznek részt a szöveti károsodás és a gyógyulás, vagy akár a malignizálódás folyamataiban (237-239).

CU-ban az MMP-9 szöveti expresszióját eddig még nem vizsgálták a nyálkahártyagyulladás súlyosságának függvényében, ill. az MMP-9 és egyes növekedési faktorok viselkedését nem tanulmányozták egyazon beteganyagban.

Ezért ebben a vizsgálati sorozatban az MMP-9, a HGR és az IGFR-1 expresszióját egyidejűleg tanulmányoztuk ép vastagbél nyálkahártyában, valamint enyhe, közepes és súlyos CU-ban (240, 241).

Az immunhisztokémiai eredményeinket gén-expressziós elemzéssel támasztottuk alá. IBD-ben a gén-expressziós technika alkalmazhatóságát másokkal együtt korábban a mi munkacsoportunk is igazolta (128, 242, 243).

Vizsgálatunkban az MMP-9 expressziója szignifikánsan nagyobb volt súlyos CU-ban, mint az egészséges nyálkahártyában. Az MMP-9 expresszió fokozódása a lamina propriában összefüggött a gyulladás súlyosságával. Megerősítettük Gao és *mtsai* (69) immunhisztokémiai eredményeit, miszerint az MMP-9 elsődleges lokalizációja a submucosa. Azt is igazoltuk, hogy a bélszövetben az MMP-9 elsődleges forrását a PMNL-sejtek képezik, a kifejezett PMNL-festődés pedig a gyulladás súlyosságával fokozódik. Amikor a vastagbél hámréteget külön vizsgáltuk, érdekes módon az immunhisztokémiai elemzés során az MMP-9 expresszió a gyulladás súlyosbodásával

fokozatosan csökkent, súlyos gyulladás során a cryptákban alig észleltünk MMP-9 expressziót.

A gén expressziós és az RT-PCR eredmények megerősítették az MMP-9 immunhisztokémiai viselkedését. A gén-expressziós és az RT-PCR elemzés során szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót igazoltunk súlyosan aktív CU-ban az egészséges kontroll csoporthoz képest. Megfigyeléseink megegyeznek a korábbi vizsgálatok eredményeivel (58, 69), miszerint ELISA, zimográfiás-aktivitási assay vagy RT-PCR módszerekkel kifejezett MMP-9 fehérje és mRNS expresszió, ill. proteolyticus aktivitás igazolható a gyulladt colitises nyálkahártyában.

A HGFR expressziót IBD-ben kevesen tanulmányozták (84, 244). Kitamura és *mtsai* (84) a HGF és a HGFR mRNS expressziót egészséges vastagbél nyálkahártyában, valamint inaktív és aktív CU-ban vizsgálták. Aktív CU-ban HGF felül-expressziót találtak az inaktív CU-hoz és az ép nyálkahártyához képest. Az aktív CU-ban néhány esetben fokozott HGFR mRNS expressziót is igazoltak.

Vizsgálatunkban a HGFR expressziója a teljes nyálkahártyában és a lamina propriában a gyulladás súlyosságával együtt fokozódott. A hámrétegben viszont a HGFR expressziója enyhe gyulladás esetében volt a legkifejezettebb, majd szignifikánsan csökkent a közepes és a súlyos gyulladás jelenlétében. A gén-expressziós eredményeink szignifikánsan fokozott expressziót igazoltak súlyos CU-ban az egészséges nyálkahártyához képest. A hámrétegben észlelt immunhisztokémiai és gén-expressziós eredmények közötti különbségek elsősorban a két technika módszertanából adódhatnak.

Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyeléseket, miszerint fokozott HGFR fehérje expresszió igazolható a lamina propriában (84). Fokozott HGFR immunreaktivitást találtunk a subepitheliális lymphoid aggregátumokban és a folliculusokban. A HGFR-pozitív lymphoid folliculusok száma párhuzamosan nőtt a gyulladás súlyosságával, amely az általunk és Kitamura és *mtsai* (84) által közölt HGFR gén-expressziós eredményeket is magyarázhatja.

Tahara és *mtsai* (72) kísérletes körülmények között kimutatták, hogy a HGF-HGFR rendszernek fontos mitogén és proliferatív hatása van a vastagbél nyálkahártyában. Eredményeink arra utalnak, hogy a HGFR expresszió változása CU-ban hozzájárulhat a hámréteg sérülésének fokozódásához.

Az IGFR-1 szerepét IBD-ben elsőként stenotizáló Crohn-betegségben (CD) tanulmányozták. A kezdeti megfigyelések arra utalnak, hogy az IGFR-1 pozitív immun- és fibroblaszt-típusú sejtek az idült gyulladás révén szerepet játszanak a bélszűkület kialakulásában (85, 245). Lawrence és *mtsai* (85) azt igazolták, hogy az IGFR-1 szerepet játszik az intestinalis ECM remodelling folyamatában. IBD-ben az IGFR-1 expresszió viselkedését a vastagbél hámrétegében eddig még nem vizsgálták. Vizsgálatunkban fokozott IGFR-1 immunreaktivitást találtunk az enyhe és közepes gyulladásban az egészséges ép hámmhoz képest, majd az IGFR-1 expresszió hirtelen csökkenést mutatott a súlyosan gyulladt hámrétegben. Hasonló csökkenést figyelhettünk meg súlyos CU-ban a gén-expressziós és az RT-PCR elemzések során. Az aktív CU-ban észlelt csökkent IGFR-1 hozzájárulhat a hám-barrier funkcionális zavarához, a hámréteg károsodás súlyosbodásához és a bélnyálkahártya fekélyek képződéséhez.

Eredményeink arra utalnak, hogy az MMP-9 és a HGFR felül-expressziója valamint az IGFR-1 epitheliális alul-expressziója szoros összefüggésben van a CU-ban észlelt gyulladás súlyosságával. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 egyidejű változása hozzájárulhat a nyálkahártya sérülés fokozódásához súlyosan aktív CU-ban. Összességében az MMP-9, HGFR és IGFR-1 aktívan részt vesz a CU gyulladásos és remodelling folyamataiban. Megfigyeléseink biológiai és klinikai szempontból egyaránt fontosak lehetnek. A súlyos CU kialakulásának kockázatát előrejelző újabb biomárcerek hasznosak lehetnek a mindennapi klinikai gyakorlatban. Egyéb márcerekkel együtt, az általunk vizsgált paraméterek (MMP-9, HGFR, IGFR-1) meghatározása megkönnyítheti a súlyos CU kialakulása szempontjából valóban nagykockázatú betegek azonosítását.

A fenti tényezők akár potenciális terápiás célpontok is lehetnek IBD-ben. Mivel a tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) szerepet játszik az MMP-9 szintézis szabályozásában, újabban feltételezik, hogy az igen összetett hatású anti-TNF- α (influximab) kezelés (246) többek között az MMP-9 aktivitását is csökkentheti, amely tovább növelve a biológiai terápia hatékonyságát IBD-ben (247).

Azt is igazolták, hogy az anti-TNF- α terápia fokozhatja az MMP-gátló TIMP-1 termelését, amely csökkenti az MMP-9 aktivitást, és így elősegíti a nyálkahártya gyógyulását (248). Végül, az MMP-k specifikus gátlói valamint azok a molekulák, amelyek visszaállítják az MMP-k és az endogén MMP-gátlók közötti megromlott

egyensúlyt, újabb célzott farmakológiai lehetőséget jelenthetnek az IBD korszerű kezelésében (249).

Másrészt a humán rekombináns HGF nemsokára rendelkezésünkre áll a fulmináns májelégtelenség kezelésében. Jóllehet további preklinikai vizsgálatokra van szükség, lehetséges, hogy a HGF IBD-ben is egy újabb modern kezelési alternatívát jelenthet, amely elősegítheti a bélnyálkahártya gyógyulását (250).

4.5. Az MMP-9 és a GST expresszió nyelőcsőben

4.5.1. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben

Az MMP-9 immunhisztokémiai expresszióját a különböző nyelőcső eltérésekben (n=51) a 28. táblázat és a 11. ábra foglalja össze.

Az MMP-9 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az ép nyelőcsőhamban (kontroll csoport), mint a BE esetében, vagy a többi csoportban. Szignifikánsan nagyobb volt az MMP-9 expresszió a BE és egyidejű dysplasia, valamint a nyelőcső adenocarcinoma csoportokban a többi vizsgált csoporthoz képest. A nyelőcső adenocarcinómában szignifikánsan nagyobb MMP-9 expressziót mértünk a BE és egyidejű dysplasia csoporthoz képest.

A Barrett metaplasiás és a dysplasiás sejtek citoplazmája, valamint az adenocarcinomás sejtek citoplazmatikus membránja barnás festődést mutatnak. A legintenzívebb MMP-9 festődést BE és egyidejű dysplasia valamint adenocarcinoma esetében lehetett megfigyelni. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziójának jellegzetességeit a 12. ábra szemlélteti.

Szövettan	MMP-9 Score (átlag ± SD)
Kontroll* (n=7)	0.28 ± 0.39
Reflux oesophagitis (n=7)	1.71 ± 0.39
Barrett nyelőcső (n=14)	1.46 ± 0.41
Barrett nyelőcső és reflux oesophagitis (n=8)	1.75 ± 0.26
Barrett nyelőcső és dysplasia # (n=7)	2.16 ± 0.25
Adenocarcinoma #,§ (n=8)	2.62 ± 0.35
ANOVA one-way	$P < 0.00001$

Statisztika:

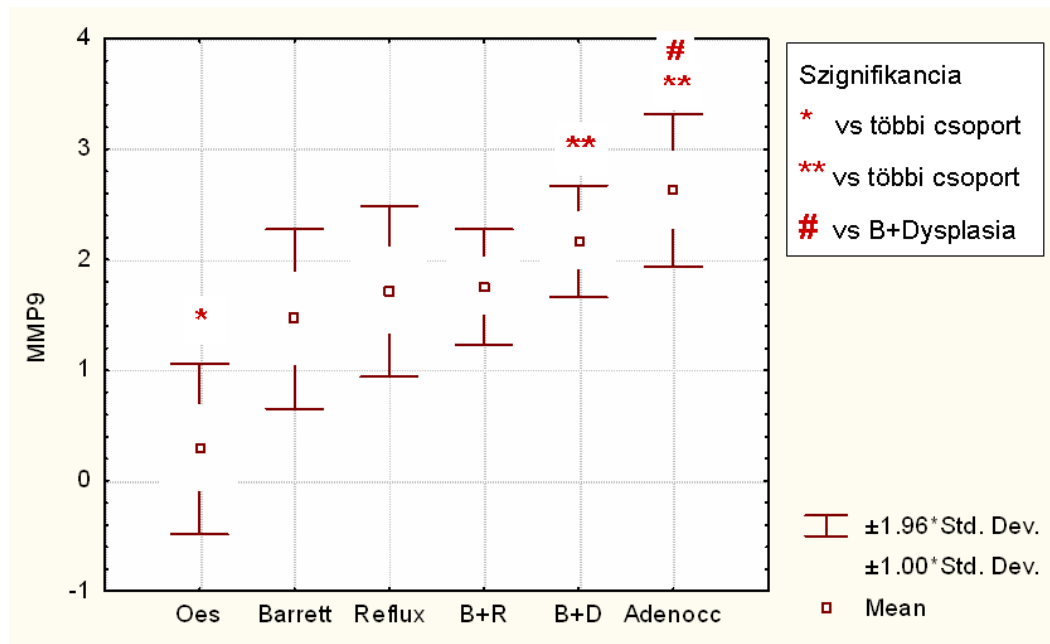
* $P < 0.00001$ vs többi csoport;

$P < 0.05$ vs többi csoport (kontroll, reflux oesophagitis, BE, BE és reflux oesophagitis);

§ $P < 0.05$ vs BE és dysplasia

Rövidítések: Kontroll: kontroll csoport, ép nyelőcső; BE: Barrett nyelőcső; Adenocarcinoma: nyelőcső adenocarcinoma Score: szemikvantitatív pontérték; SD: standard deviáció; MMP-9: mátrix metalloproteináz-9

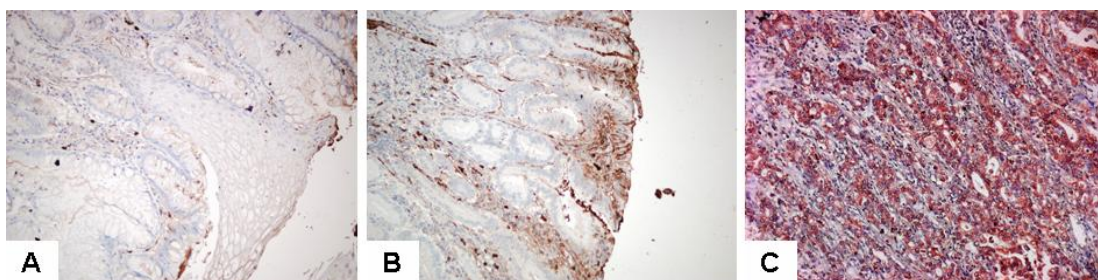
28. táblázat. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában (átlag ± SD)



Rövidítések: Oes: ép nyelőcső (kontroll csoport); Barrett: Barrett nyelőcső; Reflux: reflux oesophagitis; B+R: Barrett nyelőcső+reflux oesophagitis; B+D: Barrett nyelőcső+dysplasia; Adenoccc: adenocarcinoma; MMP-9: mátrix metalloproteináz-9

11. ábra. MMP-9 expresszió a különböző nyelőcső eltérésekben

Szignifikánsan alacsonyabb MMP-9 expresszió igazolható az ép nyelőcsőben, mint Barrett nyelőcsőben (BE) vagy a többi vizsgált csoportban ($P < 0.00001$). A BE+dysplasia és az adenocarcinoma csoportokban a többi csoportokhoz képest szignifikánsan nagyobb az MMP-9 expresszió ($P < 0.05$). A nyelőcső adenocarcinomában szignifikánsan nagyobb az MMP-9 expresszió a BE+dysplasia csoporthoz képest ($P < 0.05$).



12. ábra. Az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben

A. Barrett nyelőcső; **B.** Dysplasia; **C.** Nyelőcső adenocarcinoma (200x nagyítás)

Fokozatosan erősödő MMP-9 immunfestődés igazolható **(A)** Barrett nyelőcsőben, **(B)** dysplasiában és **(C)** nyelőcső adenocarcinomában. A metaplasziás és a dysplasiás sejtek citoplazmája, valamint az adenocarcinomás sejtek citoplazmatikus membránja barnásan festődnek. A legintenzívebb MMP-9 festődést Barrett nyelőcsőben és egyidejű dysplasiában, valamint adenocarcinomában lehet megfigyelni.

4.5.2. A GST immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben

A GST immunhisztokémiai expresszióját a vizsgált nyelőcső szekvenciában (n=51) a 29. táblázat és a 13. ábra foglalja össze. A GST expressziója szignifikánsan nagyobb volt az ép nyelőcsőhamban (kontroll csoport), mint a BE esetében vagy a többi csoportban, míg a BE, reflux oesophagitis, BE és egyidejű oesophagitis csoportok között nem volt érdemi különbség. A BE és egyidejű dysplasia, valamint a nyelőcső adenocarcinoma csoportokban szignifikánsan alacsonyabb GST expressziót találtunk a többi csoporthoz képest. Nyelőcső adenocarcinómában alig lehetett GST expressziót igazolni. A GST expresszió adenocarcinómában szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a BE és az egyidejű dysplasia csoportban.

A GST immunhisztokémiai expressziójának jellegzetességeit a 14. ábra szemlélteti.

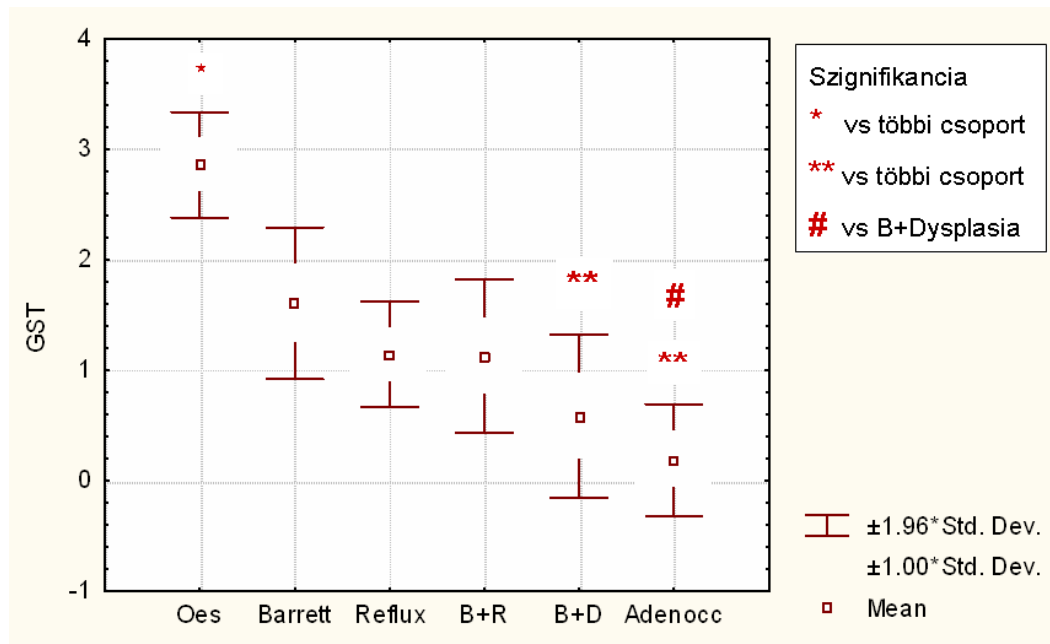
Szövettan	GST Score (átlag ± SD)
Kontroll (n=7) *	2.85 ± 0.24
Reflux oesophagitis (n=7)	1.14 ± 0.24
Barrett nyelőcső (n=14)	1.60 ± 0.34
Barrett nyelőcső és reflux oesophagitis (n=8)	1.12 ± 0.35
Barrett nyelőcső és dysplasia (n=7) #	0.58 ± 0.37
Adenocarcinoma (n=8) #, §	0.18 ± 0.25
ANOVA one way	$P < 0.00001$

Statisztika:

* $P < 0.00001$ vs többi csoport; # $P < 0.005$ vs többi csoport (kontroll, reflux oesophagitis, BE, BE és reflux oesophagitis); § $P < 0.05$ vs BE és dysplasia

Rövidítések: Kontroll: kontroll csoport, ép nyelőcső; BE: Barrett nyelőcső; Adenocarcinoma: nyelőcső adenocarcinoma; Score: szemikvantitatív pontérték; SD: standard deviáció; GST: glutathion S-transferase

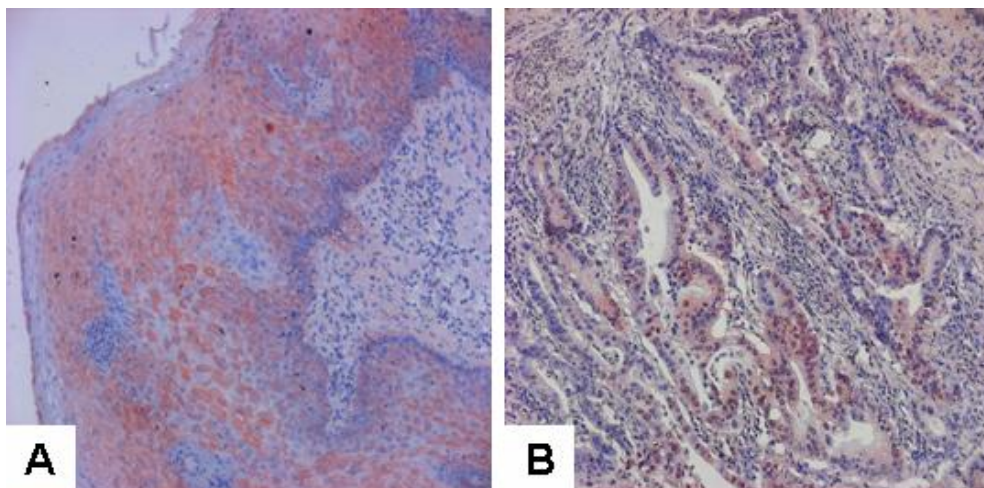
29. táblázat. A GST immunhisztokémiai expressziója az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában (átlag ± SD)



Rövidítések: Oes: ép nyelőcső (kontroll csoport); Barrett: Barrett nyelőcső; Reflux: reflux oesophagitis; B+R: Barrett nyelőcső+reflux oesophagitis; B+D: Barrett nyelőcső+dysplasia; Adenoccc: adenocarcinoma; GST: glutathion S-transferase

13. ábra. GST expresszió a különböző nyelőcső eltérésekben

Szignifikánsan nagyobb GST expresszió igazolható az ép nyelőcsőben, mint Barrett nyelőcsőben (BE) vagy a többi vizsgált csoportban ($P < 0.00001$). A BE+dysplasia és az adenocarcinoma csoportokban a többi csoportokhoz képest szignifikánsan alacsonyabb a GST expresszió ($P < 0.005$). A nyelőcső adenocarcinómában szignifikánsan alacsonyabb a GST expresszió, mint a BE+dysplasia csoportban ($P < 0.05$).



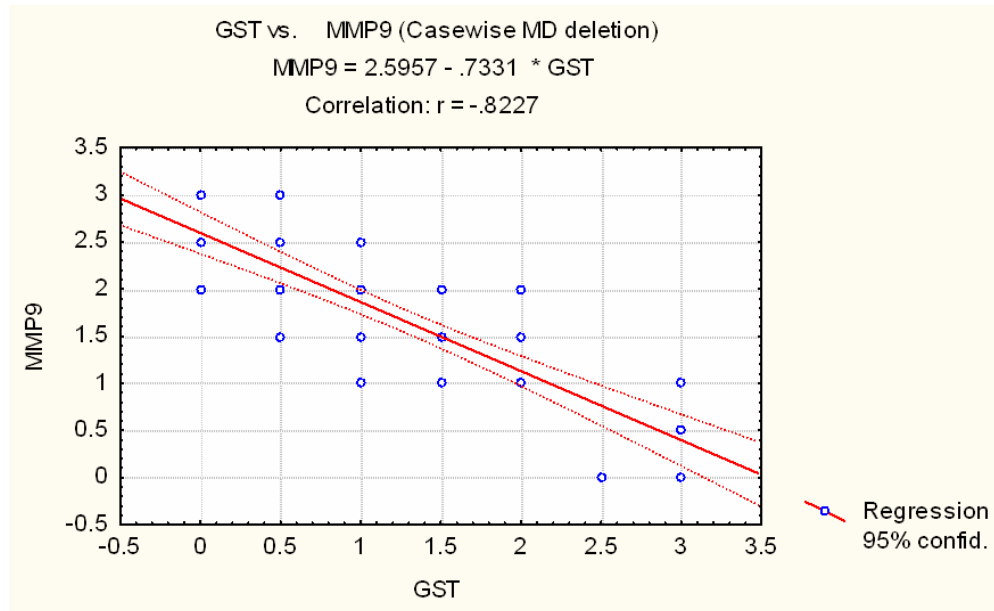
14. ábra. A GST immunhisztokémiai expressziója nyelőcsőben

A. Ép nyelőcső; **B.** Nyelőcső adenocarcinoma

A. Kifejezett GST immunfestődés ép nyelőcsőben **B.** Adenocarcinómában alig lehet GST expressziót igazolni (200x nagyítás).

4.5.3. Az MMP-9 és a GST expressziók összefüggése nyelőcsőben

A vizsgált nyelőcső szekvenciában az MMP-9 és a GST immunhisztokémiai expressziója fordított korrelációt mutatott ($r = -0.82$; $P=0.001$) (15. ábra).



15. ábra. Az MMP-9 és a GST immunhisztokémiai expressziók összefüggése nyelőcsőben.

Az MMP-9 és a GST expressziók között fordított korreláció igazolható ($r = -0.82$; $P=0.001$).

4.5.4. Megbeszélés

A BE a nyelőcső adenocarcinoma fő rákmegelőző állapota, amelyet a gastrooesophagealis refluxbetegségben (GERD) szenvedő betegek kb. 20%-ában lehet igazolni. A BE pathogenesis teljes mértékben nem ismert, de a malignus progresszió során a metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma szekvencia figyelhető meg. Az adenocarcinoma diagnózisa rendszerint későn születik meg, emiatt rossz a prognózisa (251-257).

Ezért a nagykockázatú eltérések (BE, dysplasia) azonosítása céljából újabb biomarkerekre lenne szükség, amelyek elősegíthetnék a korai diagnózist és javíthatnák a prognózist.

Nyelőcső laphámrák esetében az MMP-9 fokozott expresszióját igazolták (95-97), de nyelvőcső adenocarcinómában és rákmegelőző állapotaiban alig ismert az MMP-9 szerepe, míg az MMP-9 és a GST együttes viselkedését eddig még nem tanulmányozták nyelvőcsőben.

Vizsgálataink során a nyelvőcső eltérések teljes szekvenciájában (ép nyelvőcső -reflux oesophagitis - BE – dysplasia - nyelvőcső adenocarcinoma) az MMP-9 és a GST immunhisztokémiai expresszióját egyazon beteganyagban tanulmányoztuk (258). Eredményeink arra utalnak, hogy a GST fontos szerepet játszik a nyelvőcső carcinogenesis és progresszió folyamatában. Igazoltuk, hogy a GST expresszió szignifikánsan nagyobb volt az ép nyelvőcsőhámában, mint a többi vizsgált csoportban. Ezzel szemben BE és dysplasia jelenlétében valamint adenocarcinómában mértük a legalacsonyabb GST expressziókat; nyelvőcső adenocarcinómában alig lehetett GST expressziót kimutatni. Megfigyeléseink alátámasztják *Lieshout és mtsai* (100) valamint *Cobbe és mtsai* (102) adatait, akik BE esetében alacsonyabb GST expressziót észleltek, mint az ép nyelvőcső laphámában, míg *Brabander és mtsai* (101) szignifikánsan alacsonyabb GST expressziót mértek adenocarcinómában az ép nyelvőcső laphámhoz képest.

Az MMP-9 expressziójának vizsgálata során azt találtuk, hogy a nyelvőcső léziók súlyosbodásával párhuzamosan nőtt az MMP-9 expresszió: az ép nyelvőcső laphámában mértük a legalacsonyabb MMP-9 expressziót, míg az adenocarcinómában észlelt expresszió meghaladta a BE vagy a BE és dysplasia csoportokban mért expressziót.

A dysplasiás BE esetében a dysplasia-mentes BE-hoz képest a csökkent GST és a fokozott MMP-9 expresszió arra utal, hogy ezek az eltérések a malignizálódás korai fázisában játszhatnak szerepet. A precancerosus BE esetében az MMP-9 és a GST expresszió vizsgálata hozzásegíthet ahhoz, hogy a nyelvőcső adenocarcinoma kialakulása szempontjából azonosíthassuk a valóban nagykockázatú betegeket. A GST és az MMP-9 expressziók fordított korrelációja a két rendszer egyidejű alul- ill. felül-expressziójára utal, amely megerősíti, hogy a carcinogén anyagok detoxifikálása révén védő hatású GST ill. az agresszív hatású MMP-9 fontos tényezők a nyelvőcső adenocarcinoma többtényezős kialakulásában és progressziójában. Az MMP-9 szerepét növeli az a tény, hogy terápiás célpontként is szerepelhet (259). A nyelvőcső adenocarcinoma kezelésében az MMP-gátló prinomostattal kapcsolatos fázis II. vizsgálatok folyamatban vannak (260).

4.6. A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió nyelőcsőben

4.6.1. A sejt proliferáció (PCNA) változása nyelőcsőben

A sejt proliferáció (PCNA) változását a vizsgált nyelőcső szekvenciában (ép nyelőcső - reflux oesophagitis - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma) a 30. táblázat és a 16. ábra foglalják össze. A sejt proliferáció aránya a BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciának megfelelően fokozódott. BE esetében a sejt proliferáció szignifikánsan nagyobb volt, mint az ép hámban, de alacsonyabbnak bizonyult, mint reflux oesophagitis vagy BE és egyidejű oesophagitis esetében. A BE hámrétegében a proliferatív kompartment elsősorban a crypták aljára szorítkozott. Adenocarcinomában a sejt proliferáció szignifikánsan nagyobb volt, mint a dysplasiás BE esetében, de a proliferatív sejtek szabálytalanul oszlottak meg az invazív daganatos területeken. A PCNA expressziójának jellegzetességeit a 17-20. ábrák szemléltetik.

Szövettan	PCNA LI (átlag ± SD)
Kontroll (n=7)	36.32 ± 4.09
Reflux oesophagitis (n=7) *	61.54 ± 4.97
Barrett nyelőcső (n=14) *	51.05 ± 2.26
Barrett nyelőcső és reflux oesophagitis (n=8) *	61.52 ± 5.29
Barrett nyelőcső és dysplasia (n=7) *, #	69.35 ± 4.51
Adenocarcinoma (n=8) *, #, €	80.03 ± 4.54
ANOVA one-way	$P < 0.00001$

* $P < 0.00001$ vs Kontroll; # $P < 0.002$ vs Reflux oesophagitis, BE, BE és reflux oesophagitis; € $P < 0.02$ vs BE és dysplasia

Rövidítések: Kontroll: kontroll csoport, ép nyelőcső; BE: Barrett nyelőcső; Adenocarcinoma: nyelőcső adenocarcinoma; LI: jelölési index - labeling index; SD: standard deviáció; PCNA: PCNA proliferációs sejtmag antigén

30. táblázat. A sejt proliferáció (PCNA) immunhisztokémiai expressziója az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában (átlag ± SD)

A jelölési index (LI) a pozitív festődésű sejtmagok, és az összes leszámolt sejtmag arányát jelenti.

4.6.2. A p53 expresszió változása nyelőcsőben

A tumor szuppresszor p53 változását a vizsgált nyelőcső szekvenciában a 31. táblázat és a 16. ábra foglalják össze. A dysplasia-mentes BE és az ép nyelőcsőhám esetén mért p53 expressziók között nem volt szignifikáns különbség. Ezzel szemben a BE és egyidejű reflux oesophagitis csoportban mért p53 expresszió szignifikánsan nagyobb volt, mint BE vagy a kontroll csoport esetében. Dysplasiás BE esetében a p53 expresszió szignifikánsan meghaladta a dysplasia-mentes BE, valamint a BE és egyidejű oesophagitis csoportokban mért expressziót. A p53 expresszió adenocarcinómában szignifikánsan nagyobb volt, mint a dysplasiás BE esetében. A vizsgált nyelőcső szekvenciában a p53 immunhisztokémiai expressziójának jellegzetességeit a 17-20. ábrák szemléltetik.

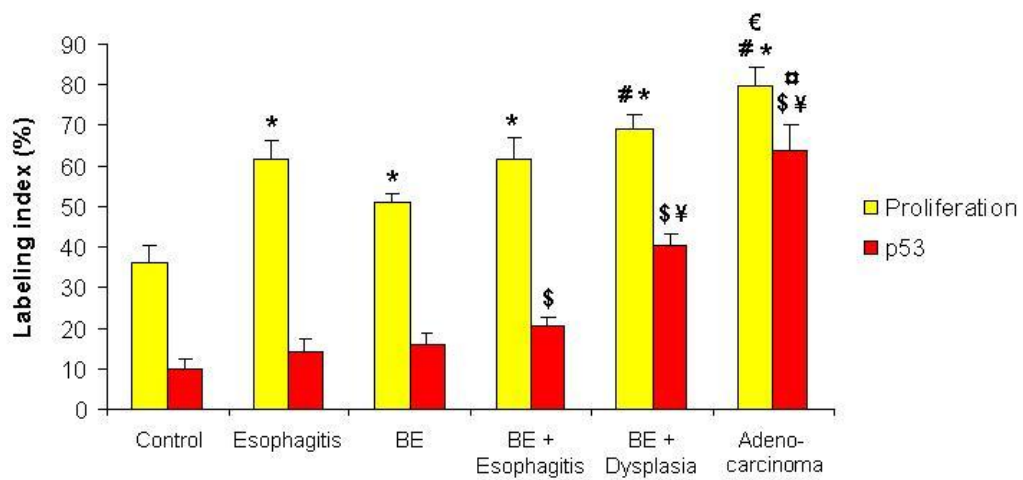
Szövettan	p53 LI (átlag ± SD)
Kontroll (n=7)	9.96 ± 1.61
Reflux oesophagitis (n=7)	13.82 ± 2.16
Barrett nyelőcső (n=14)	15.72 ± 1.93
Barrett nyelőcső és reflux oesophagitis (n=8) *	19.92 ± 1.32
Barrett nyelőcső és dysplasia (n=7) *, #	40.72 ± 5.37
Adenocarcinoma (n=8) *, #, €	63.21 ± 4.66
ANOVA one-way	P<0.001

*P<0.01 vs Kontroll, Reflux oesophagitis, BE; #P<0.003 vs Reflux oesophagitis, BE, BE és reflux oesophagitis; € P<0.03 vs BE és dysplasia

Rövidítések: Kontroll: kontroll csoport, ép nyelőcső; BE: Barrett nyelőcső; Adenocarcinoma: nyelőcső adenocarcinoma; LI: jelölési index - labeling index; SD: standard deviáció

31. táblázat. A tumor szuppresszor p53 expresszió immunhisztokémiai expressziója az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában (átlag ± SD)

A jelölési index (LI) a pozitív festődésű sejtmagok, és az összes leszámolt sejtmag arányát jelenti.



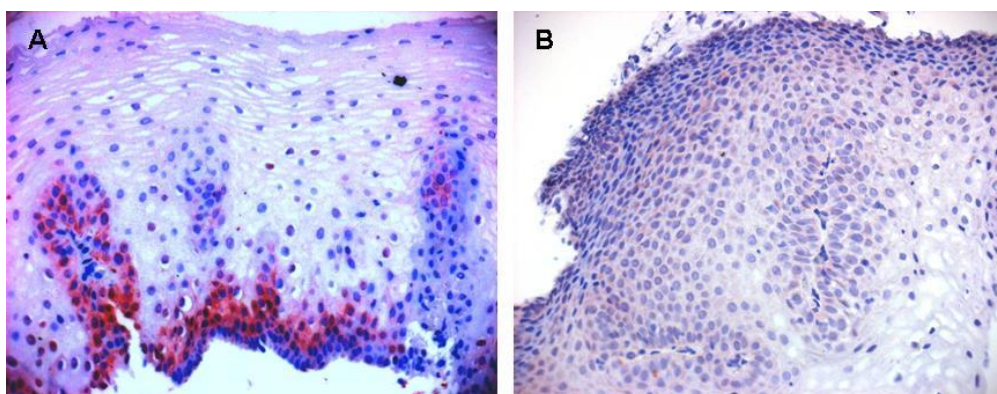
Statistika:

- * $P < 0.00001$ vs Kontroll csoport
- # $P < 0.002$ vs Reflux oesophagitis, BE, BE és egyidejű reflux oesophagitis;
- € $P < 0.02$ vs BE és egyidejű dysplasia;
- \$ $P < 0.01$ vs Kontroll csoport, Reflux oesophagitis, BE;
- ¥ $P < 0.003$ vs Reflux oesophagitis, BE, BE és egyidejű reflux oesophagitis;
- ♂ $P < 0.03$ vs BE és egyidejű dysplasia

Rövidítések: Control: kontroll csoport, ép nyelőcső; Esophagitis: reflux oesophagitis; BE: Barrett nyelőcső; Adenocarcinoma: nyelőcső adenocarcinoma; Labeling index: jelölési index; SD: standard deviáció

16. ábra. A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió a különböző nyelőcső eltérésekben (átlag ± SD)

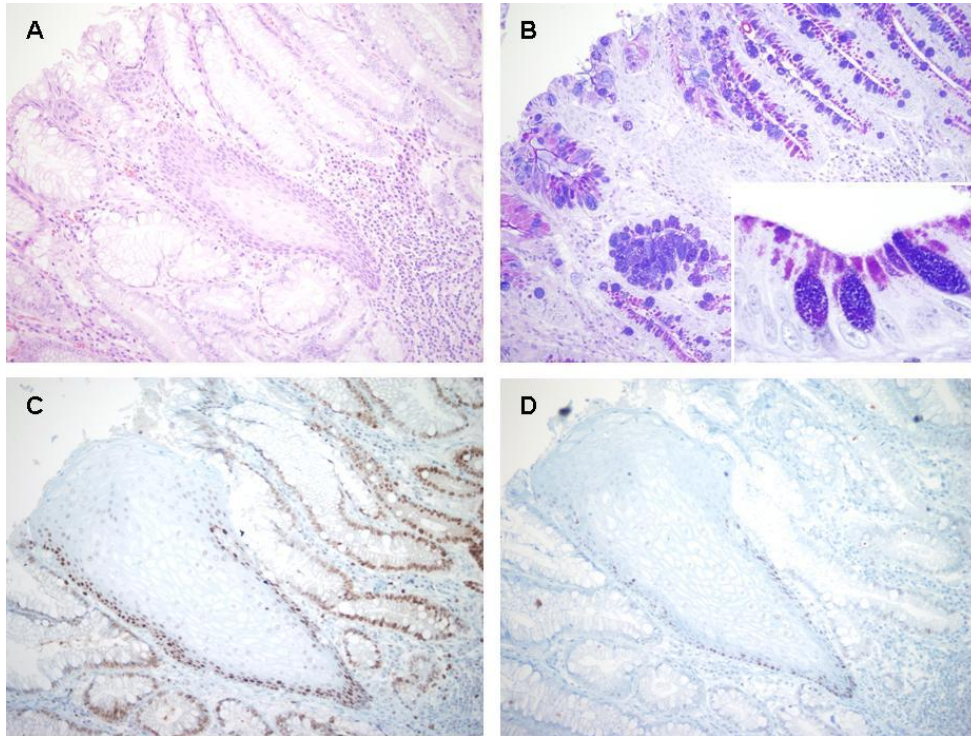
A jelölési index (LI) a pozitív festődésű sejtmagok, és az összes leszámolt sejtmag arányát jelzi.



17. ábra. Sejt proliferáció (PCNA) és p53 expresszió az ép nyelőcső hámrétegében

A. Sejt proliferáció (PCNA immunhisztokémia); **B.** p53 expresszió (400x nagyítás)

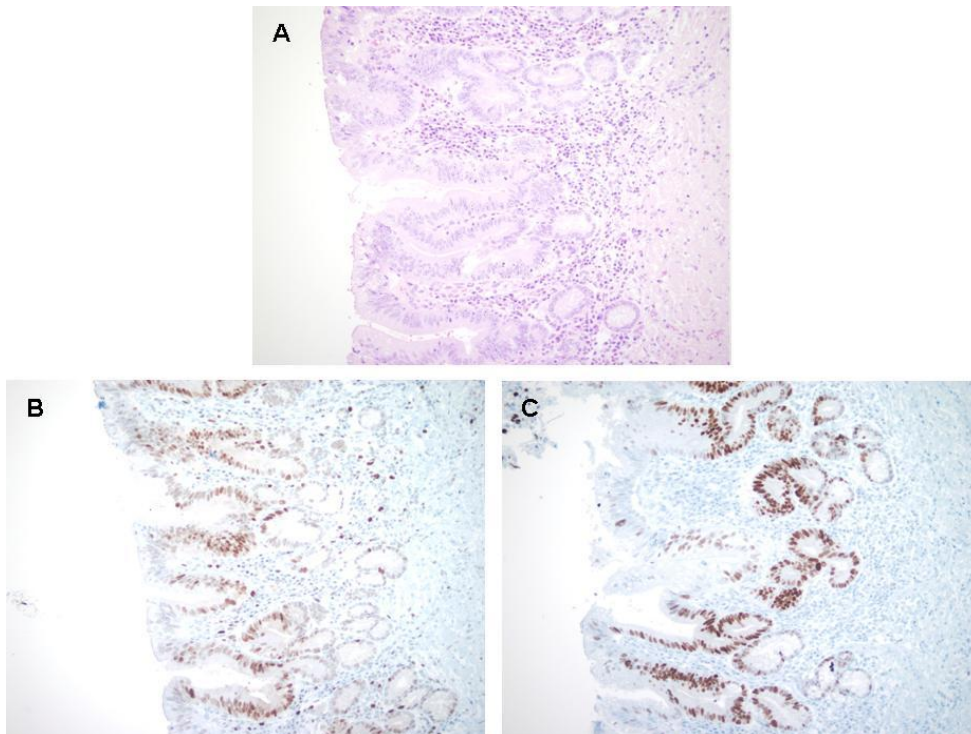
A sejt proliferációt és a p53 expressziót a magok barnás festődése jelzi.



18. ábra. A PCNA és a p53 expresszió dysplasia nélküli Barrett nyelőcsőben

A. Hematoxilin-eozin festés (200x nagyítás); **B.** Alcián kék – perjód savas – Schiff festés (200x/1000x immerziós nagyítás); **C.** Sejt proliferáció (PCNA immunhisztokémia) (200x nagyítás); **D.** p53 expresszió (200x nagyítás)

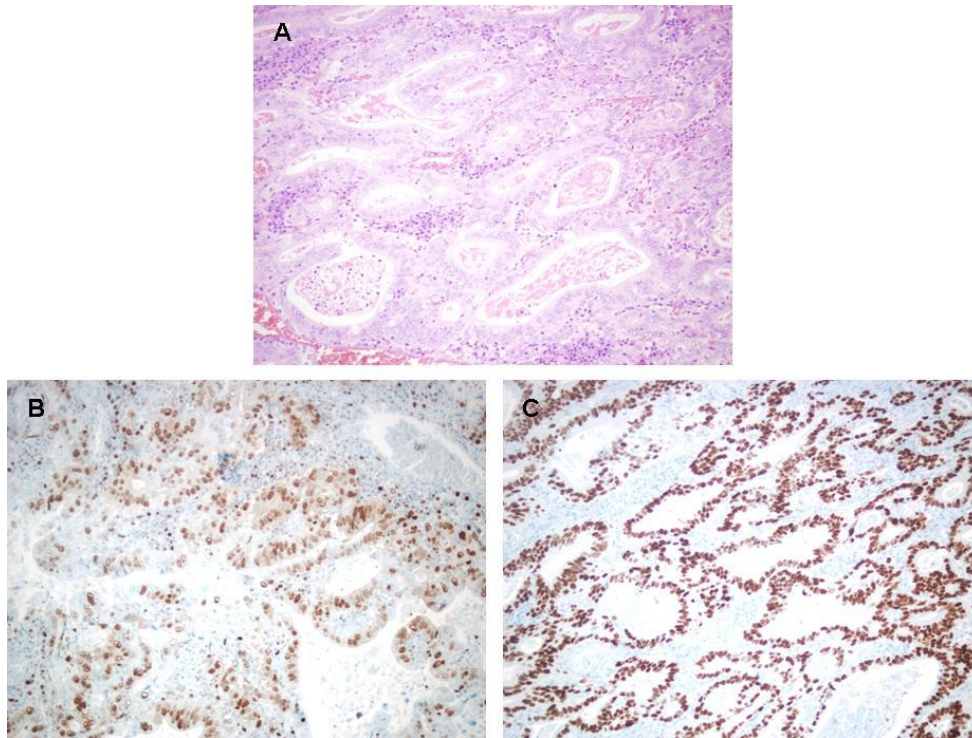
A sejt proliferációt és a p53 expressziót a sejtmagok barnás festődése jelzi.



19. ábra. A PCNA és a p53 expresszió dysplasiás Barrett nyelőcsőben

A. Hematoxilin-eozin festés; **B.** Sejt proliferáció (PCNA immunhisztokémia); **C.** p53 expresszió (200x nagyítás)

A sejt proliferációt és a p53 expressziót a sejtmagok barnás festődése jelzi.



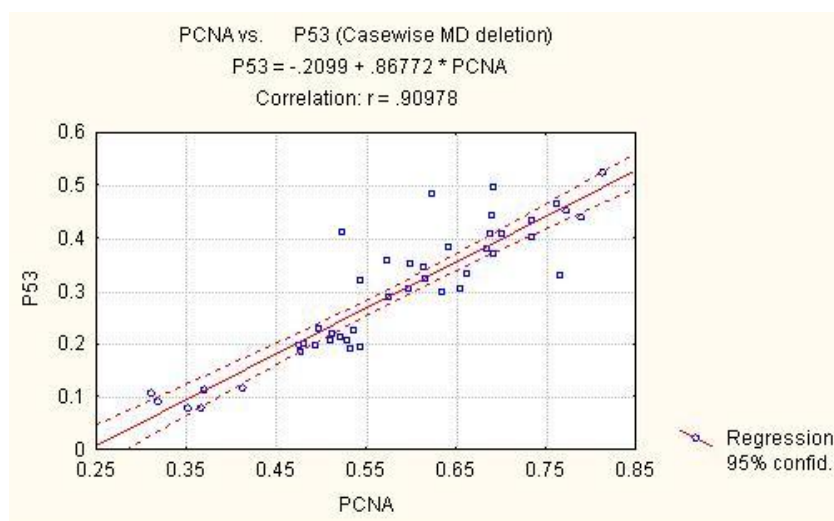
20. ábra. A PCNA és a p53 expresszió nyelőcső adenocarcinomában

A. Hematoxylin-eozin festés; B. Sejt proliferáció (PCNA immunhisztokémia); C. p53 expresszió (200x nagyítás)

A sejt proliferációt és a p53 expressziót a sejtmagok barnás festődése jelzi.

4.6.3. A sejt proliferáció és a p53 expresszió összefüggése nyelőcsőben

A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió a vizsgált nyelőcső szekvenciában szignifikáns lineáris korrelációt mutatott ($r=0.91$, $P<0.01$) (21. ábra).

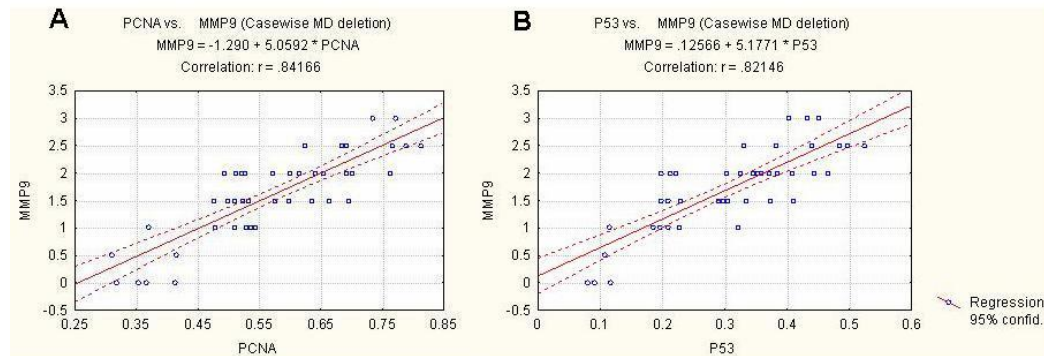


21. ábra. A sejt proliferáció és a p53 expresszió összefüggése az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia -adenocarcinoma szekvenciában

A sejt proliferáció lineárisan összefügg a p53 expresszióval ($r = 0.91$; $P<0.01$)

4.6.4. A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expresszió összefüggése az MMP-9 expresszióval nyelőcsőben

A sejt proliferáció (PCNA) és a p53 expressziók az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciában az MMP-9 immunhisztokémiai expressziójával is szignifikáns lineáris összefüggést mutattak (PCNA és MMP-9 korrelációja: $r=0.84$, $P<0.05$; p53 és MMP-9 korrelációja: $r=0.82$, $P<0.05$) (22. ábra).



22. ábra. A sejt proliferáció és a p53 expressziók összefüggése az MMP-9 expresszióval az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - Barrett nyelőcső - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciában

A. A sejt proliferáció lineárisan összefügg az MMP-9 expresszióval ($r = 0.84$; $P<0.05$).

B. A p53 expresszió lineárisan összefügg az MMP-9 expresszióval ($r = 0.82$; $P<0.05$).

4.6.5. Megbeszélés

Korábban igazolták, hogy a Barrett dysplasia esetében fokozódik a sejt proliferáció és károsodik a sejtciklus. A PCNA technika elfogadott módszer a sejt proliferáció vizsgálatára. A PCNA a DNS-polimeráz ko-faktora, amely elsősorban a késői G₁ és S fázisokban detektálható, de a sejtciklus bármely fázisában jelen van. Barrett dysplasiában a sejtciklus során a G₁ fázisból az S fázisba történő progresszió a sejt proliferáció kritikus eseménye (261-263).

Ezt a progressziót képes gátolni a tumor szuppresszor p53 (264). Korábban a p53 felül-expresszióját igazolták BE jelenlétében. A nyelőcső eltérések súlyosságának függvényében különböző mértékű expresszióról számoltak be: míg dysplasia-mentes BE betegek csak 5%-ában lehetett p53 felül-expressziót kimutatni, addig BE és LGD együttes jelenlétében 15%-ban, BE és HGD esetében 45%-ban, végül adenocarcinomában 53%-ban észleltek p53 felül-expressziót (265-268).

Korábban már felvetették, hogy a p53 mutáció és a károsodott proliferáció a dysplasia fontos márkerei lehetnek, de a fenti folyamatok jelentősége a nyelőcső carcinogenesis korai stádiumaiban még nem tisztázott kellő mértékben (103-111, 269-272).

Tudomásunk szerint a két paraméter egyidejű változását a nyelőcső betegségek teljes skálájában eddig még nem tanulmányozták. Ezért a sejt proliferáció (PCNA) és a tumor suppresszor p53 expresszió viselkedését egyazon beteganyagban az ép nyelőcső - reflux oesophagitis - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában vizsgáltuk (273).

A PCNA és a p53 expressziója alacsonyabbnak bizonyult az ép nyelőcsőben, mint a többi vizsgált csoportban. A sejt proliferáció aránya és a p53 expresszió a nyelőcső malignus transzformációja során fokozódott, követve a BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciát. Mindkét márkert esetében a legnagyobb expressziót adenocarcinomában igazoltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a sejt proliferáció és a tumor szuppresszor p53 gén expresszió aktiválódása a nyelőcső adenocarcinoma többlépcsős folyamatának már korai szakaszára jellemző, és feltételezhető, hogy az aktivációnak a további daganatos progresszióban is szerepe van. A reflux oesophagitisben észlelt eltérések - összehasonlítva a BE csoporttal - arra utalhatnak, hogy a vizsgált paraméterek aktiválódása nemcsak a nyelőcső adenocarcinoma progresszióját jellemzi, hanem a nyelőcső gyulladós folyamatainak kialakulásában is szerepet játszhat.

A korrelációs elemzés során szignifikáns összefüggést találtunk a sejt proliferáció mértéke és a p53 expresszió között. A sejt proliferáció és a p53 expresszió egyidejű aktivációja megerősíti a nyelőcső adenocarcinoma biológiájában betöltött szerepüket. Ugyanebben a beteganyagban a két márkert expresszióját az MMP-9 expressziójával is összevetettük. Az előzőekben láthattuk, hogy az MMP-9 expressziója jól követte a BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciát (258). Lineáris összefüggést találtunk a sejt proliferáció és az MMP-9, valamint a p53 és az MMP-9 expressziók között, amely arra utal, hogy a sejt proliferáció, a p53 és az MMP-9 egyaránt szerepet játszanak a nyelőcső adenocarcinoma kialakulásában, és különösen a többlépcsős nyelőcső carcinogenesis korai fázisában.

Eredményeink arra utalnak, hogy a klinikai gyakorlatban egyéb biológiai márkerekkel együtt, a sejt proliferáció és a p53 expresszió vizsgálata is elősegítheti a nyelőcső adenocarcinoma kialakulása szempontjából valóban nagykockázatú betegek azonosítását.

4.7. Hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

A gyomornyálkahártya sejtkinetikai változásait (hámsejt proliferációt, apoptosist, EGFR expressziót, p53 expressziót) 6 hónapos hagyományos NSAID- és szelektív COX-2 gátló kezelés során, valamint PPI védelemben tanulmányoztuk. A proliferáció, az apoptosis, a p53 és az EGFR expresszió változásait a 32. táblázat foglalja össze.

	Kontroll	NSAID	NSAID+PPI	COX-2	COX-2+PPI
Endoscopia	0	0	6	0	6
Proliferáció (PCNA)	42.9 ± 19.8	56.1 ± 22.4	43.3 ± 24.5#	80.3 ± 7.8*	60.7 ± 16.7€
Apoptosis (TUNEL)	49.8 ± 12.0	60.5 ± 11.1	45.8 ± 15.0#	57.4 ± 9.1	49.5 ± 6.6
p53 expresszió	28.7 ± 4.3	38.5 ± 15.8*	26.4 ± 3.9#	31.3 ± 8.9	23.7 ± 8.4€
EGFR expresszió	17.6 ± 11.9	10.7 ± 8.9*	17.4 ± 7.7#	8.7 ± 5.6*	16.1 ± 5.4€

Statisztika:

* $P < 0.05$ vs Kontroll

$P < 0.05$ vs NSAID

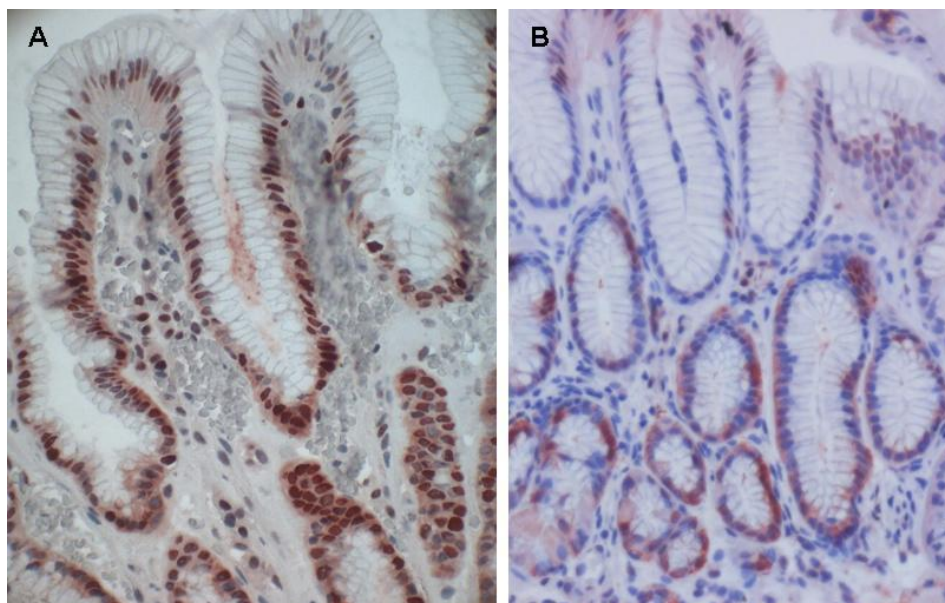
€ $P < 0.05$ vs COX-2

Rövidítések: Kontroll=kontroll csoport; NSAID=hagyományos nem szelektív NSAID; COX-2= szelektív COX-2 gátló; PPI= protonpumpa gátló

32. táblázat. A gyomornyálkahártya sejtkinetikai változásai (sejt proliferáció, apoptosis, p53 expresszió, EGFR expresszió) 6 hónapos hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló kezelés során, valamint PPI védelemben (átlag ± SD)

4.7.1. A sejt proliferáció változása a gyomornyálkahártyában

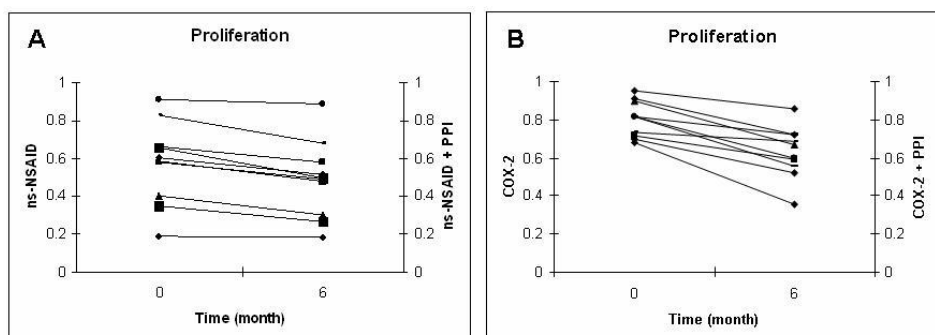
A gyomornyálkahártya hámsejt proliferációja szignifikánsan nagyobb volt szelektív COX-2 kezelés mellett, míg hagyományos NSAID kezelés során csupán emelkedő tendenciát észleltünk a kontroll csoporthoz képest. A fokozott proliferációt a PPI védelem mindkét kezelés során normalizálta (32. táblázat; 23. és 24. ábrák).



23. ábra. Sejt proliferáció szelektív COX-2 gátló kezelés során

A. PPI kezelés előtt (400x nagyítás); **B.** PPI kezelést követően (400x nagyítás)

A sejt proliferációt a sejtmagok barnás festődése jelzi.



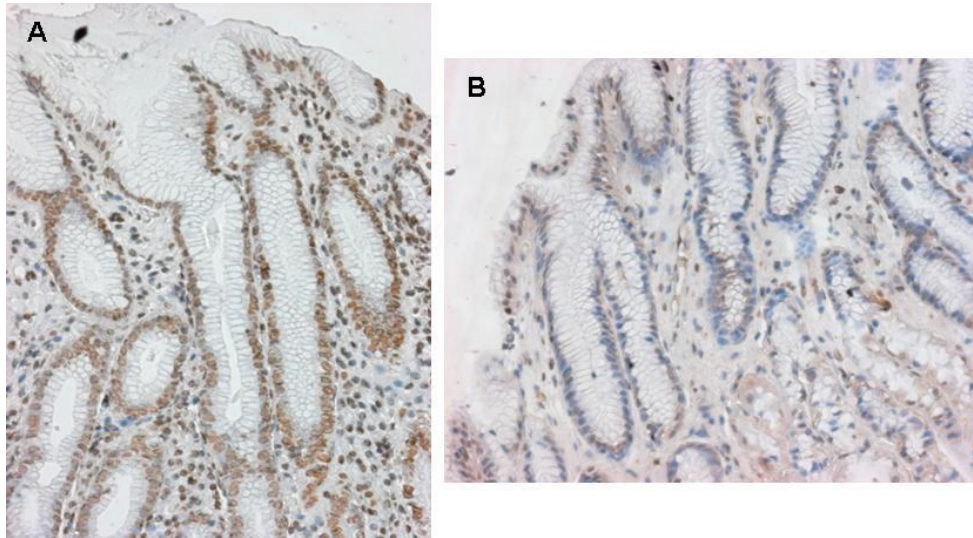
Rövidítések: Proliferation: sejt proliferáció; ns-NSAID: hagyományos nem szelektív NSAID; COX-2: szelektív COX-2 gátló; PPI: protonpumpa gátló

24. ábra. A sejt proliferáció egyéni változásai PPI kezelés előtt és után

A. Hagományos nem szelektív NSAID kezelés; **B.** Szelektív COX-2 gátló kezelés
A PPI kezelés hatása a sejt proliferációra.

4.7.2. Az apoptózis változása a gyomornyálkahártyában

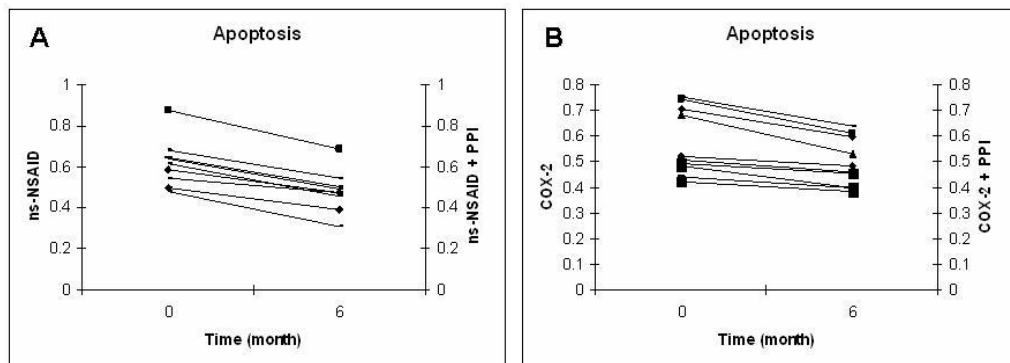
A hagyományos NSAID és a szelektív COX-2 csoportok között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Mindkét csoportban emelkedő tendenciát lehetett megfigyelni a kontroll csoporthoz képest. A PPI kezelés mindkét csoportban normalizálta a fokozottabb apoptosist (32. táblázat; 25. és 26. ábrák).



25. ábra. Apoptosis hagyományos nem szelektív NSAID kezelés során

A. PPI kezelés előtt (200x nagyítás); **B.** PPI kezelést követően (200x nagyítás)

Az apoptosist a sejtmagok barnás festődése jelzi.



Rövidítések: ns-NSAID: hagyományos nem szelektív NSAID; COX-2: szelektív COX-2 gátló; PPI: protonpumpa gátló

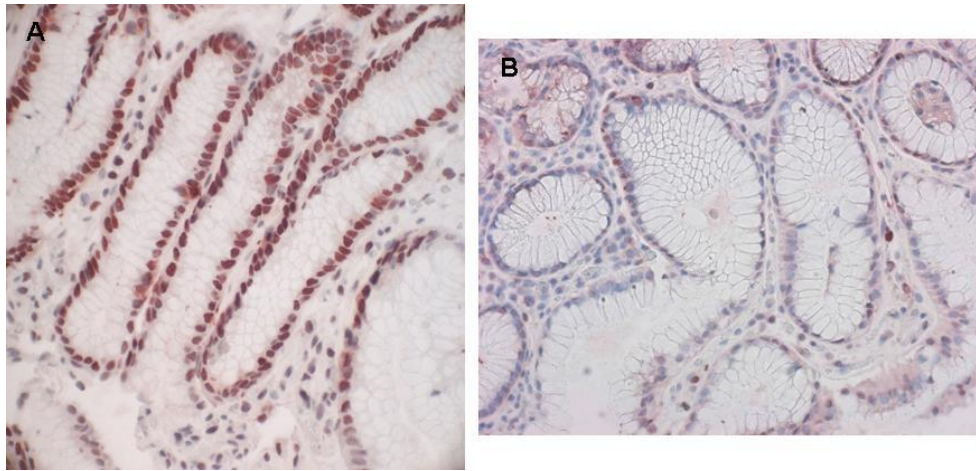
26. ábra. Az apoptosis egyéni változásai PPI kezelés előtt és után

A. Hagományos nem szelektív NSAID kezelés; **B.** Szelektív COX-2 gátló kezelés

A PPI kezelés hatása az apoptosira.

4.7.3. A p53 expresszió változása a gyomornyálkahártyában

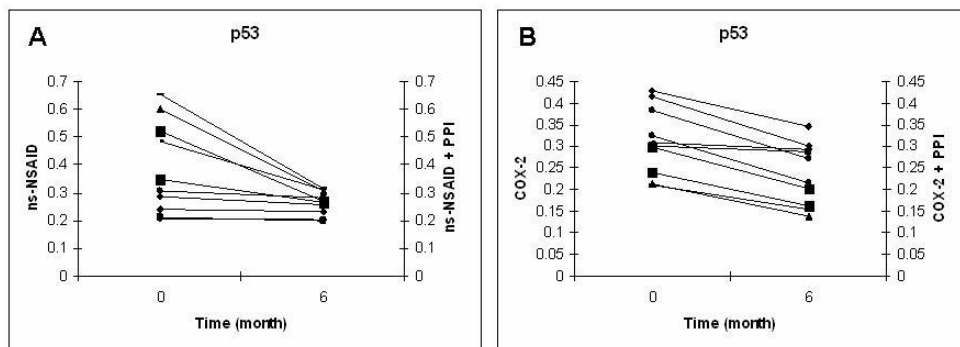
A p53 expresszió a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb volt a hagyományos NSAID kezelés esetében, míg a szelektív COX-2 gátló kezelésnek nem volt ilyen jellegű hatása. A PPI kezelés mindkét csoportban csökkentette a p53 expressziót (32. táblázat; 27. és 28. ábrák).



27. ábra. A p53 expresszió hagyományos NSAID kezelés során

A. PPI kezelés előtt (400x nagyítás); **B.** PPI kezelést követően (400x nagyítás)

A p53 expressziót a sejtmagok barnás festődése jelzi.



Rövidítések: p53: p53 expresszió; ns-NSAID: hagyományos nem szelektív NSAID; COX-2: szelektív COX-2 gátló; PPI: protonpumpa gátló

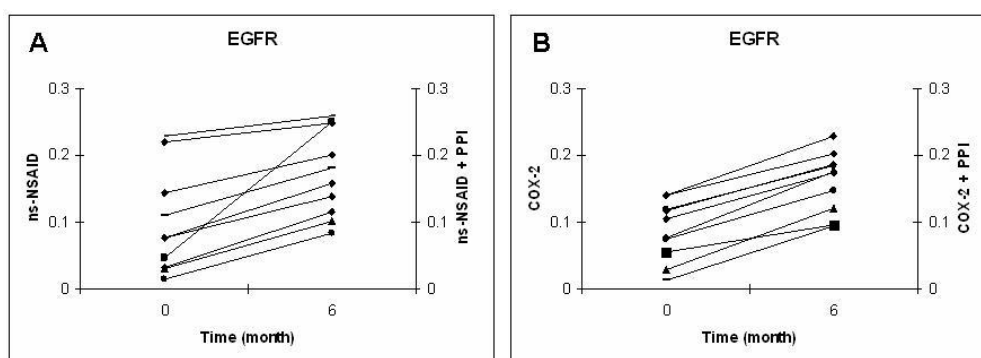
28. ábra. A p53 expresszió egyéni változásai PPI kezelés előtt és után

A. Hagyományos nem szelektív NSAID kezelés; **B.** Szelektív COX-2 gátló kezelés

A PPI kezelés hatása a p53 expresszióra.

4.7.4. Az EGFR expresszió változása a gyomornyálkahártyában

Az EGFR expresszió a hagyományos NSAID és a szelektív COX-2 gátló kezelés során egyaránt szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban (kifejezettebb expresszió-csökkenést észleltünk a szelektív COX-2 csoportban). A PPI kezelés mindkét csoportban normalizálta az expressziót (32. táblázat; 29. ábra).



Rövidítések: EGFR: EGFR expresszió; ns-NSAID: hagyományos nem szelektív NSAID; COX-2: szelektív COX-2 gátló; PPI: protonpumpa gátló

29. ábra. Az EGFR expresszió egyéni változásai PPI kezelés előtt és után

A. Hagyományos nem szelektív NSAID kezelés; B. Szelektív COX-2 gátló kezelés

A PPI kezelés hatása az EGFR expresszióra.

4.7.5. Megbeszélés

Jól ismert tény, hogy a hagyományos NSAID szerek alkalmazása során számottevő felső és alsó tápcsatornai mellékhatásokkal kell számolni, a tápcsatornai vérzés és perforáció mortalitása pedig igen jelentős (274-279).

A hagyományos NSAID-szerek alkalmazása során észlelt jelentős morbiditás és mortalitás vezetett a szelektív COX-2 gátlók kifejlesztéséhez, amelyeknek szignifikánsan alacsonyabb a GI mellékhatása (280-286).

Mivel kevés információnk van a nem szelektív NSAID és a szelektív COX-2 gátló szereknek a gyomornyálkahártya sejtkenetkájára kifejtett hatásáról, ebben a vizsgálatosorozatban a gyomornyálkahártya sejtkenetkai változásait (sejt proliferációt; apoptosist; EGFR expressziót; p53 expressziót) hagyományos NSAID, szelektív COX-2 gátló kezelés során, ill. PPI védelemben tanulmányoztuk (287, 288).

A korábbi klinikai vizsgálatok azt találták, hogy a hagyományos NSAID-szerek csak kismértékben befolyásolják a sejt turnover-t a gyomornyálkahártyában (112, 289, 290). A szelektív COX-2 gátlók esetében az eddig közölt kísérletes eredmények arra utalnak, hogy daganatos sejtvonalakon fokozzák az apoptosist, a nem-daganatos gyomornyálkahártyában viszont alig befolyásolják a sejt turnover-t, gátolják a sejt proliferációt és a sejt növekedést, késleltetik a sebgyógyulását (114, 115, 291, 292).

A sejt turnover-re kifejtett hatás vizsgálatok azt találtuk, hogy a hagyományos NSAID-kezelés a növekvő tendencia ellenére nem befolyásolta szignifikáns módon a sejt proliferációt és az apoptosist. Eredményeink összhangban vannak a korábban közölt adatokkal (112, 289, 290).

A tartós szelektív COX-2 gátló kezelés mellett viszont fokozott hámsejt proliferációt igazoltunk a kontroll csoporthoz képest. Ez részben ellentmond a korábbi, állatmodellekben fekélygyógyulást vizsgáló experimentális adatoknak, de összhangban van Imatani és *mtsai* (293) humán gyomornyálkahártyában igazolt eredményeivel. Vizsgálatunkban a COX-2 gátló kezelés során az apoptosis megemelkedett a kontroll csoporthoz képest, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Ez részben a kis esetszámmal és/vagy a viszonylag rövid (6 hónapos) követési időtartammal függhet össze. Mivel korábban kísérletes körülmények között inkomplett intestinalis metaplasia jelenlétében fokozott p53 expressziót és sejt turnover-t igazoltak (294), a p53 expresszió viselkedését is tanulmányoztuk. Hagyományos NSAID kezelés mellett szignifikánsan emelkedett p53 expressziót találtunk, míg COX-2 kezelés során a p53 expresszió változása nem bizonyult szignifikánsnak, amely arra utalhat, hogy COX-2 kezelés során a DNS károsodás mértéke és az apoptosis fokozódása nem jelentős.

Vizsgálatunk legváratlanabb eredménye, hogy az NSAID és szelektív COX-2 gátló kezelések során egyaránt csökkent az EGFR expresszió. A morfológiai vizsgálatokból jól ismert, hogy egészséges gyomornyálkahártyában EGFR immunreaktivitás mutatható ki a parietális sejtekben és a fundus mirigyek nyáktermelő sejtjeiben, míg a proliferatív zónában rendszerint egyidejű EGFR és PCNA aktivitás igazolható (294). A PCNA és az EGFR expressziók ellentétes viselkedését nem tudjuk egyértelműen megmagyarázni. Feltételezhető, hogy a sejt proliferációt EGFR-független mechanizmus befolyásolhatja.

Jól ismert, hogy a szelektív COX-2 gátló kezelés kevesebb felső tápcsatornai mellékhatással és nyálkahártya károsodással jár. Eredményeink arra utalnak, hogy a

szelektív COX-2 gátló kezelés során észlelhető kevesebb mellékhatás részben a fokozott sejt proliferációval hozható összefüggésbe. Úgy tűnik, hogy ez a mechanizmus független az EGFR expressziótól.

Igazoltuk, hogy a PPI kezelés a hagyományos NSAID és a szelektív COX-2 gátló kezelés során egyaránt normalizálja a károsodott sejtkinetikát. A PPI-kezelés a fokozott sejt proliferáció és p53 expresszió mellett a csökkent EGFR expressziót is normalizálta. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a gyomornyálkahártya sejtkinetikai változásaiban a savszekréciónak döntő szerepe lehet.

4.8. Tartós PPI kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

4.8.1. Az omeprazol és az esomeprazol kezelés sejtkinetikai hatásai

A tartós PPI kezelésnek a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára kifejtett hatását *H. pylori* negatív reflux oesophagitiszes betegekben tanulmányoztuk, akik 6 hónapig napi 20 mg omeprazol vagy napi 40 mg esomeprazol kezelésben résztultek.

A PPI kezelés előtti ill. a 6 hónapos PPI kezelést követő proliferációs index, apoptózis, p53 és EGFR expresszió változásait a 33. és 34. táblázatok foglalják össze.

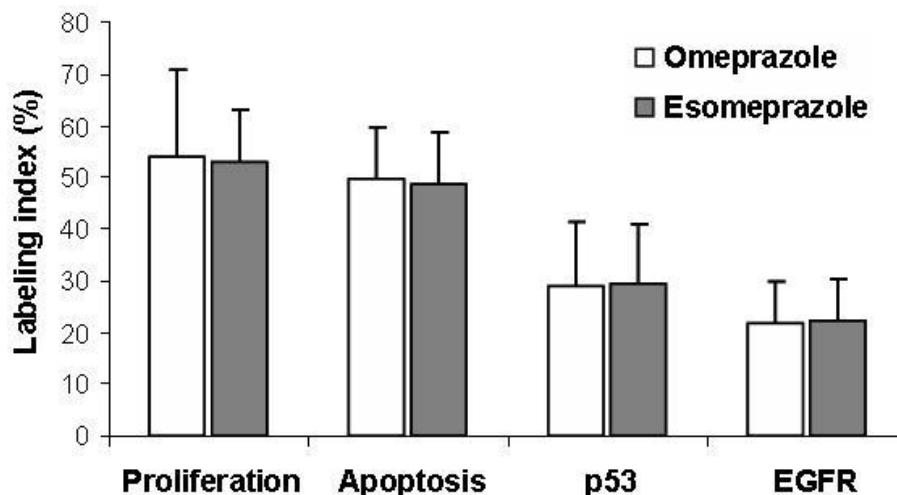
	Omeprazol kezelés (n=14)	
	0	6
Endoscopia (hónapok)		
Proliferációs index (%)	40.9 ± 13.8	54.1 ± 16.6
Apoptosis (%)	45.3 ± 8.7	49.5 ± 10.3
p53 (%)	28.7 ± 4.3	28.9 ± 12.7
EGFR (%)	17.6 ± 11.9	21.9 ± 7.9

33. táblázat. Tartós omeprazol kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára (átlag ± SD)

	Esomeprazol kezelés (n=12)	
	0	6
Endoscopia (hónapok)		
Proliferációs index (%)	39.6 ± 8.7	52.8 ± 10.4
Apoptosis (%)	43.5 ± 9.8	48.9 ± 9.8
p53 (%)	29.2 ± 10.7	29.6 ± 11.5
EGFR (%)	16.8 ± 8.1	22.3 ± 8.1

34. táblázat. Tartós esomeprazol kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára (átlag ± SD)

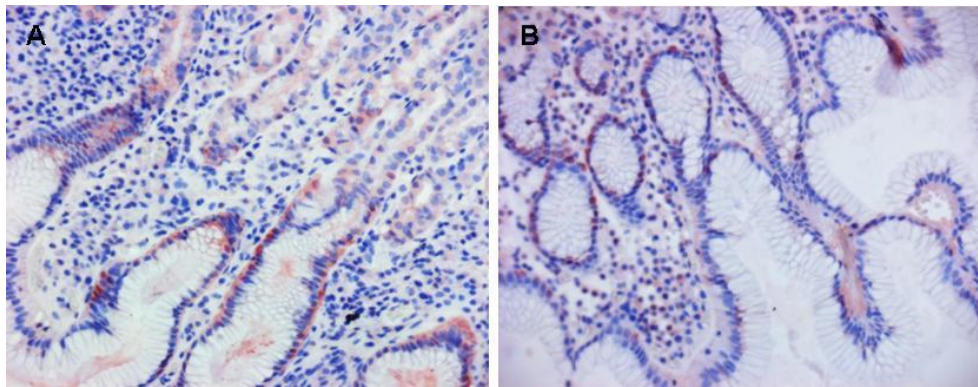
A gyomornyálkahártya sejt turnoverjére kifejtett hatásban a két PPI kezelés között nincs szignifikáns különbség (30. ábra). Tartós PPI kezelés során az omeprazol és az esomeprazol csoportokban csupán enyhén fokozódó sejt proliferációt és EGFR expressziót igazoltunk, de a növekedés nem volt szignifikáns. Az apoptózis és a p53 expresszió nem változott a két PPI kezelés ideje alatt.



30. ábra. Az omeprazol és az esomeprazol kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára (átlag ± SD)

A jelölési index (LI) a pozitív festődésű sejtmagok, és az összes leszámolt sejtmag arányát jelenti. A gyomornyálkahártya sejt turnoverjére kifejtett hatásban nincs szignifikáns különbség a két PPI kezelés között.

PPI kezelés hatására csak az immunhisztokémiai festődési denzitás lokalizációjában találtunk észlelhető különbséget. Az ép gyomornyálkahártyában PPI kezelés előtt a legnagyobb proliferációs aktivitást a nyaki kompartmentben észleltük. A PPI terápia hatására létrejött legnagyobb sejt proliferáció növekedést a gyomornyálkahártya mirigy-sejt régiójában találtuk. A proliferáció növekedés a crypták legmélyebb részére korlátozódott (31. ábra). A parietális sejtek a kezelés előtt és a PPI kezelés után sem mutattak PCNA pozitivitást.



31. ábra. PCNA immunhisztokémiai expresszió a gyomornyálkahártyában tartós PPI kezelés során

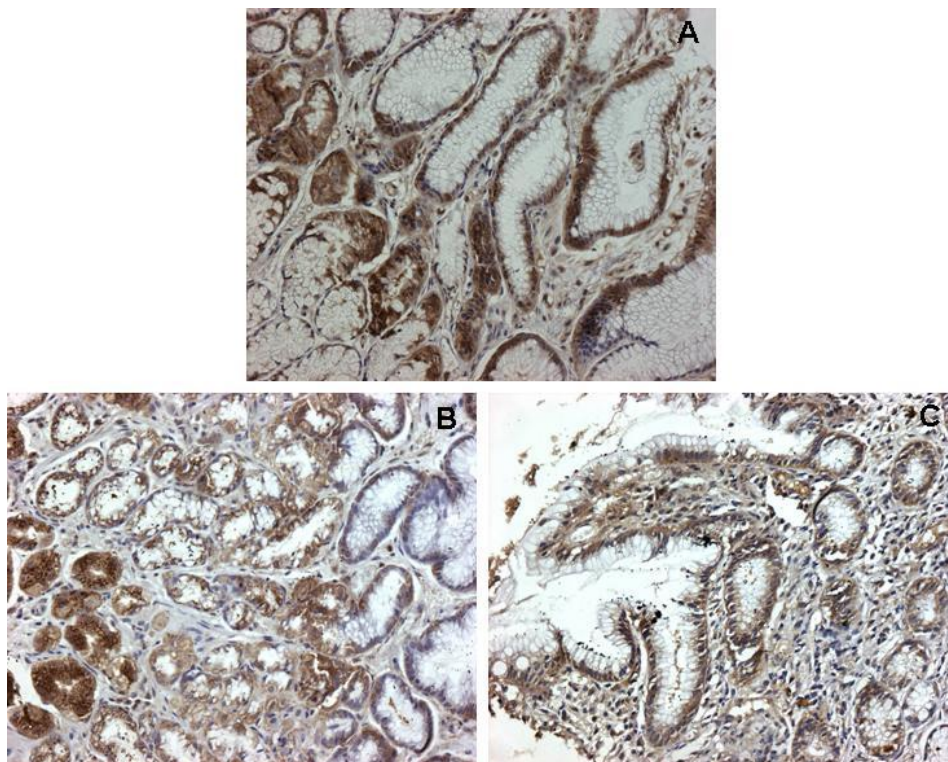
A. PPI kezelés előtt (200x nagyítás); **B.** PPI kezelést követően (200x nagyítás)

A sejt proliferációt a sejtmagok barnás festődése jelzi.

A. PPI kezelés előtt a legnagyobb proliferációs aktivitás a gyomornyálkahártyában a nyaki kompartmentben észlelhető.

B. PPI kezelés után a PCNA denzitás növekedés a mirigy kompartment mélyebb régióiban figyelhető meg.

PPI kezelés előtt az ép gyomornyálkahártyában a parietális sejtek és a gyomor fundus mirigyek nyaki sejtjei mutattak pozitív EGFR expressziót. Az EGFR expresszió a basolateralis membránra lokalizálódott, de nem érintette az apicalis luminalis membránt. PPI kezelés után erősen pozitív EGFR immunreaktivitást találtunk a hámsejtek basolateralis membránjában, a citoplazmában és a supranuclearis régióban. Pozitív EGFR expressziót igazoltunk néhány parietális sejtben is (a citoplazmában és a plazma membránban), de az expresszió mértéke gyengébb volt, mint a nyaki-sejt kompartmentben (32. ábra).



32. ábra. EGFR immunhisztokémiai expresszió a gyomornyálkahártyában tartós PPI kezelés során

A. PPI kezelés előtt (200x nagyítás); B - C. PPI kezelést követően (200x nagyítás)

A sejt proliferációt a sejtmagok barnás festődése jelzi.

4.8.2. Megbeszélés

A gyomornyálkahártya integritásának fenntartásához alapvető a sejt turnover egyensúlyának biztosítása. A fokozott sejt turnover daganat képződéséhez, míg a gátolt turnover fekély kialakulásához vezethet (113).

Kísérletes körülmények között igazolták, hogy a hosszú távú omeprazol kezelés reverzibilisen fokozza a sejt proliferációt és gátolja a differenciációt (296, 297).

Más vizsgálatokban viszont a tartós omeprazol kezelés nem növelte a sejt proliferációt, ill. nem nőtt a hypergastrinoma vagy a gyomorrák kialakulásának kockázata (298-300).

Vizsgálatunkban két PPI (omeprazol és esomeprazol) kezelésnek a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára kifejtett hatását *H. pylori* negatív reflux oesophagitis betegeken tanulmányoztuk (301, 302).

Igazoltuk, hogy a tartós (6 hónapos) PPI kezelés nem befolyásolja érdemben a gyomornyálkahártya sejt proliferációját, az EGFR expressziót, és nincs hatással az apoptosusra vagy a p53 expresszióra.

Nem találtunk érdemi eltérést a hosszú távú omeprazol és esomeprazol kezelések sejtkinetikai hatásai között.

Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, melyek szerint a gyomornyálkahártya sejt proliferációja nem változik szignifikáns mértékben a tartós PPI kezelés során (298-300).

Az a tény, hogy nem károsodik a sejt proliferáció és a celluláris válasz, továbbá megmarad a sejt proliferáció és apoptosis közötti egyensúly, megerősíti a tartós PPI kezelés klinikai biztonságosságát. A sejtkinetikai egyensúly fenntartása további biztosíték arra, hogy a tartós PPI kezelés során nem fokozódik a hyperplasia, a dysplasia vagy a malignizálódás kockázata (303-306).

4.9. A secretoros leucocyta protease inhibitor (SLPI) expresszió különböző etiológiájú gastritisekben

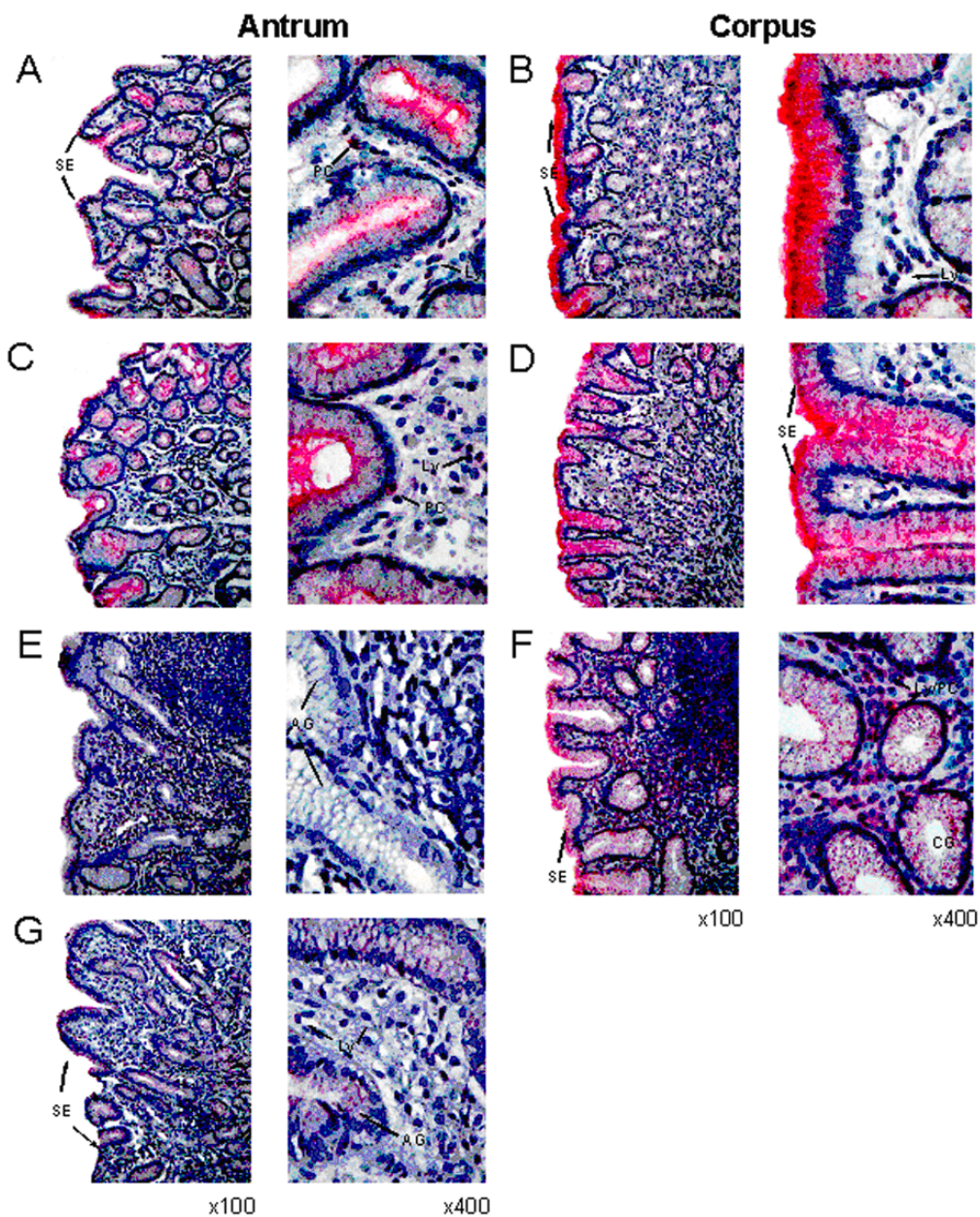
Az SLPI expressziót *H. pylori*-asszociált gastritis mellett NSAID-asszociált, autoimmun, valamint lymphocitás gastritisekben tanulmányoztuk.

4.9.1. Az SLPI immunhisztokémiai expresszió jellegzetességei gastritisekben

A *H. pylori* negatív esetekben (kontroll csoportban és NSAID-asszociált gastritisben) a hámsejtekben és a mély foveoláris mirigyekben kifejezett citoplazmatikus anti-SLPI antitest-festődést figyeltünk meg (33. ábra; A-D). A mirigyek apicalis membránjának intenzív festődése azzal magyarázható, hogy az SLPI egy secretoros fehérje.

A *H. pylori*-asszociált gastritis esetében és lymphocitás gastritisben (amely rendszerint egy korábban lezajlott *H. pylori* fertőzés eredménye) az SLPI festődés kifejezetten csökkent, vagy alig volt detektálható (33. ábra; E, G).

A hámsejtek mellett az immunsejtek is hozzájárultak a nyálkahártya SLPI expressziójához. Az immunsejtek fenotípusát illetően a lymphociták és plazmasejtek esetében lehetett SLPI-expressziót igazolni, míg a neutrophil granulocyták nem mutattak SLPI immunreaktivitást (33. ábra; C, F).



Jelmagyarázat: (A) + (B): Kontroll csoport; (C)+(D): NSAID-asszociált gastritis; (E): *H. pylori*-asszociált gastritis; (F): Autoimmun gastritis; (G): Lymphocitás gastritis;
 SE: (surface) felszíni hám; AG: antralis mirigyek; CG: atrophiás corpus mirigyek; DG: (deep) mély antralis mirigyek; Ly: lymphocita; PC: plazmasejt

33. ábra. Az SLPI immunhisztokémiai expressziója különböző etiológiájú gastritisekben

A citoplazmatikus SLPI expresszió mértéke függ a lokalizációtól. A hámsejtekben, a mély foveoláris mirigyekben és a lamina propria immunsejtjeiben (lymphocitákban, plazmasejtekben) kifejezettebb SLPI expresszió figyelhető meg. Az SLPI expresszió általában fokozottabb az antralis nyálkahártyában, mint a corpusban. Az SLPI expressziót a vörös szín jelzi, míg a sejtmagok hematoxinin festődésűek.

4.9.2. Az SLPI expresszió összehasonlítása különböző etiológiájú gastritisekben egy szemikvantitatív pontrendszer alapján

Az alkalmazott szemikvantitatív score rendszer alapján megállapítottuk, hogy a legkifejezettebb SLPI expresszió a kontroll csoport antralis nyálkahártyájában igazolható.

NSAID-asszociált gastritisben az antrum és corpus SLPI expressziója alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

H. pylori-asszociált gastritis esetében az antralis nyálkahártya SLPI expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban (34. A. ábra).

Lymphocitás gastritisben az SLPI expresszió hasonlóan alacsony volt (34. A. ábra).

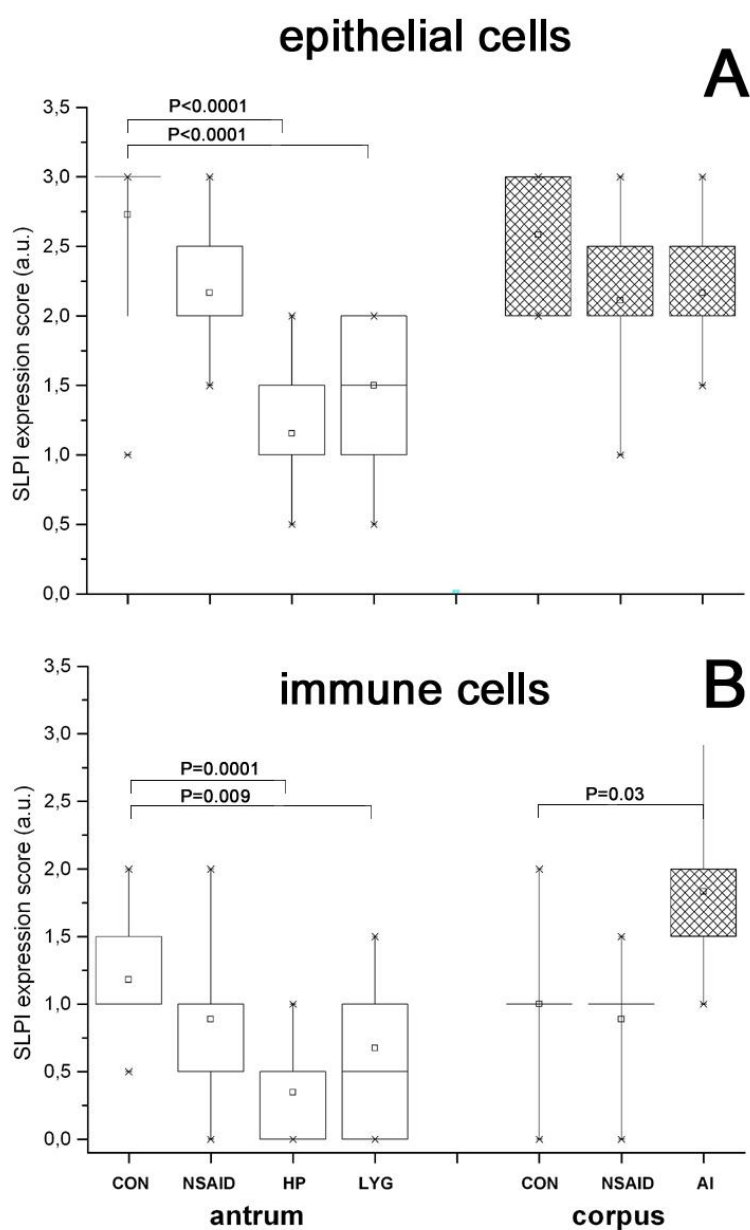
Ezzel szemben az NSAID-asszociált vagy az autoimmun gastritisben a corpus hámrétegében az SLPI expresszió nem különbözött érdemben a kontroll csoporthoz képest (34. A. ábra).

Mivel az immunsejtek eltérő infiltrációja befolyásolja a gastritis típusát, továbbá a nyálkahártya SLPI expressziójához az immunsejtek is hozzájárulnak, az egyes immunsejtek SLPI expresszióját külön-külön is vizsgáltuk.

Összességében az SLPI expressziót mutató immunsejtek aránya minden vizsgált csoportban alacsonyabb volt, mint az SLPI-t expresszáló hámsejtek aránya.

A *H. pylori*-asszociált és a lymphocytás gastritisekben az antrum nyálkahártyát infiltráló lymphocyták és plazmasejtek szignifikánsan alacsonyabb SLPI expresszióját észleltük, míg az NSAID-asszociált gastritisben az immunsejtek SLPI expressziója az antrumban és corpusban változatlan volt (34. B. ábra).

Autoimmun gastritisben a corpuszt infiltráló immunsejtek SLPI-expressziója kifejezettebb volt, mint a kontroll csoportban vagy az NSAID-asszociált gastritisben (34. B. ábra).



Jelmegnyarázat: A Y-tengely az immunhisztokémiai szemikvantitatív score értékeket mutatja. Az X-tengely a különböző csoportokat jelzi: (CON=Kontroll csoport; NSAID=NSAID-asszociált gastritis; HP=*H.pylori*-asszociált gastritis; LYG=Lymphocitás gastritis, AI=Autoimmun gastritis).

34. ábra. Az SLPI immunhisztokémiai expresszió összehasonlítása különböző etiológiájú gastritisekben egy szemikvantitatív pontrendszer alapján

Az **A. ábra** a hámsejtek, a **B. ábra** az immunsejtek adatait tartalmazza. Az üres négyzetek az antrum, a csíkozott négyzetek a corpus nyálkahártya adatait jelzik. A csoportok közötti szignifikanciát a *P*-értékek mutatják.

4.9.3. Megbeszélés

Az SLPI többfunkciós fehérje, amely szerin proteázok gátlása mellett szerepet játszik a sejt proliferáció szabályozásában, és a sebgyógyulást is elősegíti (116-121). Korábban *H. pylori*-asszociált gastritisben csökkent antralis SLPI koncentrációt igazoltak, de nem egyértelmű, hogy a csökkent expresszió mennyire függ össze a *H. pylori* fertőzéssel (307, 308). E kérdés megválaszolására *H. pylori*-asszociált gastritis mellett más etiológiájú (NSAID-asszociált, autoimmun, lymphocitás) gastritisekben is tanulmányoztuk az SLPI expressziót (309).

A *H. pylori* negatív kontroll csoporthoz képest az antrum nyálkahártyájában szignifikánsan alacsonyabb SLPI expressziót igazoltunk *H. pylori*-asszociált és lymphocitás gastritisekben, míg az epithelialis SLPI expresszió mértékét az NSAID-asszociált és az autoimmun gastritisek nem befolyásolták. A *H. pylori*-asszociált és a lymphocitás gastritisekben az antrum nyálkahártyáját infiltráló lymphociták és plazmasejtek szignifikánsan alacsonyabb SLPI expresszióját igazoltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy az antrum nyálkahártya helyi SLPI alul-expressziója specifikusan kötődik a *H. pylori* fertőzéshez és ez a csökkenés nem tekinthető a nyálkahártyagyulladás általános velejárójának.

Egy újabb vizsgálat, amelyben a *H. pylori* és a kis dózisu-aszpirin (ASA) hatásait tanulmányozták az SLPI expresszióra, megerősíti eredményeinket. Fordított összefüggés igazolódott a *H. pylori*-asszociált gyulladás mértéke és az SLPI expresszió között, míg az ASA kezelés nem befolyásolta az SLPI expressziót. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy a *H. pylori* fertőzés a kis dózisu ASA kezeléstől függetlenül befolyásolja az antralis SLPI down-regulációját (310).

A gyomornyálkahártyában a csökkent SLPI expresszió funkcionális következménye nem egyértelmű. A csökkent antralis SLPI részben szerin proteázok (pl. cathepsin G, elastase) proteolyticus aktivitását befolyásolhatja. Zhu és *mtsai* (311) igazolták, hogy az SLPI és az elastase expresszió közötti egyensúly meghatározza két hámeredetű szabályozó faktor, a proepithelin és epithelin arányát, amelyek a nyálkahártya gyulladás folyamatát szabályozzák. Másrészt igazolták, hogy az SLPI, a nukleáris factor kappa B jelrendszeren keresztül, gyulladási folyamatokban is szerepet játszik (312, 313). Végül az SLPI-nek közvetlen antimikrobás hatása is lehet a *H. pylori* kórokozóval szemben, mivel igazolták, hogy az SLPI egyaránt gátolja a Gram-pozitív és negatív baktériumok növekedését (117, 314).

5. KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

5.1. Cisztein és szerin proteázok szöveti vizsgálata CRC-ben

Az általunk vizsgált két proteolyticus enzimrendszer (a cisztein proteáz CATB, CATL, valamint a PA/inhibitor rendszer) egyidejű viselkedését egyazon colorectális tumoros beteganyagban elsőként tanulmányoztuk az irodalomban. A cathepsinek és a PA/inhibitor rendszer szöveti koncentrációinak egymás közötti szignifikáns korrelációja arra utal, hogy ez a két proteolyticus enzimes család egyidejűleg aktiválódik a colorectalis daganatos invázió és áttétképzés folyamataiban.

CRC-ben elsőként igazoltuk a vizsgált proteázok érzékeny prognosztikai szerepét. Kimutattuk, hogy a CATL, uPA és PAI-1 szöveti antigén koncentrációi szorosan összefüggnek a túléléssel. A szöveti proteázok meghatározása már a preoperatív szakban, vagyis a Dukes stádium ismerete előtt fontos prognosztikai információkkal szolgálhat a klinikai gyakorlatban.

5.2. A proteolyticus enzimek tumor márkere szerepe

Igazoltuk, hogy a preoperatív szérumban CATB és CATL, valamint a plazma uPA és PAI-1 koncentrációk szignifikánsan megemelkednek a CRC betegek perifériás vármintáiban a kontroll daganatmentes csoporthoz képest. A diagnózis felállításakor a proteázok érzékenyebben jelezték a CRC diagnózist, mint a CEA vagy a CA 19-9. Eredményeink felhívják a figyelmet a többtényezős (multiparametrikus) tumor márkere elemzés jelentőségére. Ez a megközelítés növelte a CRC felismerésének esélyét.

Az univariáns túlélési elemzés során igazoltuk, hogy a szérumban CATB, CATL és a plazma PAI-1 antigén koncentrációk a CRC érzékeny prognosztikai tényezői. A multivariáns túlélési elemzés során a szérumban CATB és a plazma PAI-1 a Dukes stádiumtól független prognosztikai tényezőknek bizonyultak.

A szérumban CATB és a plazmában uPA egyidejű klinikai viselkedését a CRC mellett gyomor-, máj- és pancreasrákos betegekben is tanulmányoztuk. Igazoltuk, hogy a preoperatív szérumban CATB és a plazmában uPA koncentrációk szignifikánsan nagyobbak a GI daganatokban, mint a kontroll csoportban. Kimutattuk, hogy a szérumban CATB és a plazmában uPA koncentrációk a GI daganatok érzékeny tumor márkerei.

Elsőként igazoltuk, hogy a szérumban cathepsinek és a plazmában PA/inhibitor rendszer antigén koncentrációi szignifikánsan megemelkednek a colorectalis adenomák ill. a GED betegek perifériás vérmintáiban a kontroll csoporthoz képest, alátámasztva a colorectalis ill. a gyomor szöveti mintákban nyert adatokat. Eredményeink arra utalnak, hogy a proteolyticus enzimek a GI rákmegelőző eltérések malignus transzformációjában is szerepet játszanak. A precancerosus laesiók esetében a perifériás vérmintákból történő proteázok meghatározása hozzásegíthet a malignizálódás szempontjából valóban nagykockázatú betegek azonosításához.

5.3. Az MMP-9 expressziója CRC-ben

Az MMP-9 expresszióját eddig még nem vizsgálták az ép vastagbél nyálkahártya - adenoma - dysplasia - CRC szekvenciában. Igazoltuk, hogy az MMP-9 immunhisztokémiai expressziója szignifikánsan nagyobb volt a daganatos szövetben, mint a daganatmentes normális vastagbél nyálkahártyában. Colorectalis adenomákban az MMP-9 expresszió alapján egyértelműen el lehetett különíteni a dysplasiás és dysplasia-mentes területeket. Az MMP-9 immunhisztokémiai expresszió intenzitása jól követte a vastagbél eltérések súlyosságát, vagyis a normális szövet - adenoma - dysplasia - CRC szekvenciát. Eredményeink arra utalnak, hogy az MMP-9 fontos szerepet játszik a CRC kialakulásában és az invazivitás egyik márkerevének tekinthető. Az immunhisztokémiai eredményeink megerősítésére és validálására TaqMan RT-PCR elemzést végeztünk, amely alátámasztotta a fontosabb immunhisztokémiai adatainkat.

5.4. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 expresszió colitis ulcerosában

Az MMP-9 expresszióját eddig még nem vizsgálták a nyálkahártyagyulladás súlyosságának függvényében, ill. az MMP-9, HGFR és IGFR-1 viselkedését nem tanulmányozták egyazon CU beteganyagban. Kimutattuk, hogy az MMP-9 expressziója szignifikánsan nagyobb súlyos CU-ban, mint az ép nyálkahártyában; az MMP-9 expresszió fokozódása a lamina propriában összefüggött a gyulladás súlyosságával. A HGFR expressziója a teljes nyálkahártyában és a lamina propriában a gyulladás súlyosságával párhuzamosan növekedett. Az IGFR-1 viszont fokozott immunreaktivitást mutatott az enyhe és közepes gyulladásban az ép hámréteghez képest, majd az expresszió hirtelen csökkenését figyeltük meg a súlyosan gyulladt hámrétegben. A gén expressziós és az RT-PCR elemzések megerősítették a fontosabb immunhisztokémiai eredményeket. Igazoltuk, hogy az MMP-9 és a HGFR felül-expressziója valamint az IGFR-1 epitheliális alul-expressziója szoros összefüggésben vannak a gyulladás súlyosságával. Az MMP-9, a HGFR és az IGFR-1 egyidejű változása hozzájárulhat a nyálkahártya sérülés fokozódásához.

5.5. Az MMP-9 és a GST expresszió vizsgálata nyelőcsőben

Az MMP-9 és a GST egyidejű viselkedését eddig még nem tanulmányozták az ép nyelőcső - oesophagitis - BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciában. Szignifikánsan nagyobb GST ill. szignifikánsan alacsonyabb MMP-9 expressziót találtunk az ép nyelőcsőben a többi csoporthoz képest. A GST expresszió csökkenése ill. az MMP-9 expresszió növekedése jól követte a BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciát. A dysplasiás BE esetében a dysplasia-mentes BE-hoz képest a csökkent GST ill. a fokozott MMP-9 expresszió alapján feltételezhető, hogy ezek az eltérések a malignizálódás korai fázisában is szerepet játszanak. A GST és az MMP-9 egyidejű alul- ill. felül-expressziója arra utal, hogy a carcinogén anyagok detoxifikálása révén védő hatású GST ill. az agresszív hatású MMP-9 fontos tényezők a nyelőcső adenocarcinoma többtényezős kialakulásában és progressziójában. Az MMP-9 és a GST expresszió vizsgálata BE esetében hozzásegíthet a nyelőcső adenocarcinoma kialakulása szempontjából valóban nagykockázatú betegek azonosításához.

5.6. A sejt proliferáció (PCNA) és a tumor szuppresszor p53 expresszió vizsgálata nyelőcsőben

A sejt proliferáció (PCNA) és a tumor szuppresszor hatású p53 expresszió egyidejű változását a nyelőcső eltérések széles skálájában (az ép nyelőcső - oesophagitis - BE - dysplasia - nyelőcső adenocarcinoma szekvenciában) eddig még nem vizsgálták. Kimutattuk, hogy a PCNA és a p53 expressziója alacsonyabb az ép nyelőcsőben, mint a többi vizsgált csoportban. A sejt proliferáció aránya és a p53 expresszió a nyelőcső malignus transzformációja során fokozódott, követve a BE - dysplasia - adenocarcinoma szekvenciát. Mindkét márkert esetében a legnagyobb expressziót adenocarcinomában igazoltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a sejt proliferáció és a tumor szuppresszor p53 gén expresszió aktiválása a nyelőcső adenocarcinoma többlépcsős folyamatának már korai szakaszában megjelenik, és a további daganatos progresszióban is szerepe van. Igazoltuk, hogy a vizsgált paraméterek a nyelőcső gyulladással járó folyamataiban is aktiválódnak. Eredményeink arra utalnak, hogy a fokozott PCNA és p53 expresszió, a fokozott MMP-9 és csökkent GST expressziókkal együtt a BE malignus transzformációjának hasznos márkerei lehetnek a klinikai gyakorlatban.

5.7. Hagyományos NSAID és szelektív COX-2 gátló kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

A gyomornyálkahártyában fokozott hámsejt proliferációt igazoltunk tartós szelektív COX-2 gátló kezelés mellett, míg a hagyományos NSAID kezelés során nem mutatkozott ilyen eltérés. Hagyományos NSAID kezelés mellett szignifikánsan nagyobb p53 expressziót találtunk, míg COX-2 kezelés során a p53 expresszió fokozódás kisebb mértékű. Mindkét kezelés során egyaránt szignifikánsan csökkent az EGFR expresszió. Eredményeink arra utalnak, hogy a szelektív COX-2 gátló kezeléssel kapcsolatos ritkább GI mellékhatás részben a fokozott sejt proliferációval hozható összefüggésbe. Ez a mechanizmus vélhetően független az EGFR expressziótól. Kimutattuk, hogy a PPI kezelés megszünteti és helyreállítja a hagyományos NSAID és a szelektív COX-2 kezelésekkal összefüggő sejtkinetikai eltéréseket. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a gyomornyálkahártya sejtkinetikai változásaiban a savszekréciónak döntő szerepe lehet.

5.8. Tartós PPI kezelés hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára

Igazoltuk, hogy a tartós (6 hónapos) PPI kezelés nem befolyásolja érdemben a gyomornyálkahártya sejt proliferációját, az EGFR expressziót, de az apoptosira vagy a p53 expresszióra nincs hatással.

Nem találtunk eltérést a tartós omeprazol és esomeprazol kezelések sejtkinetikai hatásai között.

Az a tény, hogy nem károsodik a sejt proliferáció és a celluláris válasz, továbbá megmarad a sejt proliferáció és apoptosira közötti egyensúly, megerősíti a tartós PPI kezelés klinikai biztonságosságát.

5.9. Az SLPI expresszió különböző etiológiájú gastritisekben

A *H. pylori* negatív kontroll csoporthoz képest a gyomor antralis nyálkahártyájában szignifikánsan alacsonyabb SLPI expressziót igazoltunk *H. pylori*-asszociált gastritisben és lymphocitás gastritisben, míg az epithelialis SLPI expresszió mértékét az NSAID-asszociált és az autoimmun gastritis nem befolyásolta.

A *H. pylori*-asszociált és a lymphocitás gastritisekben az antrum nyálkahártyát infiltráló lymphociták és plazmasejtek szignifikánsan alacsonyabb SLPI expresszióját mutattuk ki.

Igazoltuk, hogy a gyomor antralis nyálkahártya lokális SLPI alul-expressziója specifikusan kötődik a *H. pylori* fertőzéshez, független más agresszív tényezőktől (pl. NSAID kezelés károsító hatásától), így az SLPI expresszió csökkenés nem tekinthető a nyálkahártyagyulladás általános velejárájának.

Legfontosabb új megállapítások

1. CRC-ben a vizsgált szöveti proteolyticus enzimrendszerek (cathepsinek, PA/inhibitor rendszer, MMP-9) fontos tényezők a CRC biológiájában, különösen a daganatos invázióban és az áttétképzésben.
2. A szöveti cathepsinek és PA/inhibitor rendszer a CRC érzékeny prognosztikai tényezői.
3. A proteázok szérum ill. plazma koncentrációi ígéretes tumor márkerekként viselkednek CRC-ben és egyéb GI daganatokban. A szérum CATB, CATL és a plazma PAI-1 antigén koncentrációk a CRC érzékeny prognosztikai tényezői.
4. Colorectalis adenoma ill. gyomor GED jelenlétében a cathepsinek és a PA/inhibitor rendszer koncentrációi a perifériás vérmintákban szignifikánsan megemelkednek, amely arra utal, hogy a proteolyticus enzimek az emésztőszervi precancerosus laesiók malignus transzformációjában is szerepet játszanak.
5. Az MMP-9 és a HGFR felül-expressziója valamint az IGFR-1 alul-expressziója szoros összefüggésben van a CU súlyosságával. Az MMP-9, HGFR és IGFR-1 egyidejű változása hozzájárulhat a nyálkahártya károsodás súlyosbodásához.
6. Az MMP-9, a GST, valamint a p53 és a PCNA expressziók változásai a Barrett metaplasia malignus transzformációjának hasznos márkerei.
7. A PPI kezelés megszünteti és helyreállítja a hagyományos NSAID és a szelektív COX-2 kezeléssel összefüggő sejtkinetikai eltéréseket.
8. A tartós PPI kezelés során nem károsodik a sejt proliferáció és a celluláris válasz, továbbá megmarad a sejt proliferáció és apoptózis közötti egyensúly, amelyek alátámasztják a tartós PPI kezelés biztonságosságát.
9. A gyomornyálkahártyában védő hatással rendelkező SLPI alul-expressziója specifikusan kötődik a *H. pylori* fertőzéshez.

6. IRODALOM

1. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991, 51: S5054-5059.
2. Polgar L. Common feature of the four types of protease mechanisms. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990; 371 (Suppl): 327- 331.
3. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636-639.
4. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-1457.
5. Nigam AK, Pignatelli M, Boulos PB. Current concepts in metastasis. *Gut* 1994; 35: 996-1000.
6. Pauli BU, Kudson W. Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations. *Hum Pathol* 1988; 19: 628-639.
7. Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E, Liotta LA. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *J Cell Biol* 1990; 110: 1427-1438.
8. Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rozhin J. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 333-335.
9. Sloane BF. Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer* 1990, 1: 137-152.
10. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chuchowolski N, Calvete J, Kramer M. Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (pro-UPA). *J Biol Chem* 1991; 145: 307-314.
11. Premzl A, Turk V, Kos J. Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *J Cell Biochem* 2006, 97: 1230-1240.
12. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Garziloric J, Reynolds JJ. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1992, 667: 1-12.
13. Vassali JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 1991; 88: 1067-1072.

14. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44: 139-266.
15. Dano K, Behrendt N, Hoyer-Hansen G, Johnson M, Lund LR, Ploug M, Romer J. Plasminogen activations and cancer. *Thromb Haemost* 2005, 93: 676-681.
16. Blasi F. Surface receptors for urokinase plasminogen activator. *Fibrinolysis* 1988; 2: 246-250.
17. Cohen R, Xi X, Crowley C, Lucas B, Levinson B, Shuman M. Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood* 1991; 78: 479-487.
18. Krueger S, Kalinski T, Wolf H, Kellner U, Roessner A. Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture-regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Lett* 2005; 223: 313-322.
19. Cavallo-Medved D, Mai J, Dosesco J, Sameni M, Sloane BF. Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 1493-1503.
20. Plebani M, Herszényi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, De Paoli M, Rugge M, Nitti D, Naccarato R, Farinati F. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995; 76: 367-375.
21. Plebani M, Herszényi L, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. Urokinase-type plasminogen activator receptor in gastric cancer: tissue expression and prognostic role. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 418-425.
22. Farinati F, Herszényi L, Plebani M, Carraro P, Cardin R, De Paoli M, Roveroni G, Rugge M, Nitti D, Naccarato R. Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2581-2587.
23. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process- first American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740.
24. Farinati F, Cardin R, Della Libera G, Rugge M, Herszényi L, Di Mario F, Molari A, Plebani M, Naccarato R. Determinants for the development of chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia in the stomach. *Eur J Cancer Prev* 1995; 4: 181-186.

25. Wodzinski MA, Bardhan KD, Reilly JT, Cooper P, Preston FE. Reduced tissue type plasminogen activator activity in the gastroduodenal mucosa in peptic ulcer disease. *Gut* 1993; 34: 1310-1314.
26. Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Di Mario F, Kusstatscher S, Rugge M, Cardin R, Naccarato R, Farinati F. Impaired fibrinolysis and protease activation in gastric and duodenal mucosa of patients with active duodenal ulcer. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 843-847.
27. Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991; 49: 341-346.
28. Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler S, Sordat B. Cystatin and cathepsin B in human colon carcinoma. Expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer* 1992; 52: 645-652.
29. Adenis A, Huet G, Zerimech F, Hecquet B, Balduyck M, Peyrat JP. Cathepsin B, L, and D activities in colorectal carcinomas: relationship with clinical-pathological parameters. *Cancer Lett* 1995; 96: 267-275.
30. Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, Xynopoulos D, Arnogianaki N, Plataniotis G, Yotis J, Agnanti N. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Lett* 2004; 205: 97-106.
31. Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, Duffy MJ, Hyland JM, O'Donoghue DP. Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal progression. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1610-1616.
32. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Eriksen J, Dano K. The plasminogen activation system in human colon cancer: messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells in the tumor stroma. *Cancer Res* 1991; 51: 4067-4071.
33. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138: 1059-1067.
34. Sier CF, Vloedgraven HJM, Ganesh S, Griffioen G, Quax PH, Verheijen JH, Dooijewaard G, Welvaart K, van de Velde CJ, Lamers CB. Inactive urokinase and increased levels of its inhibitors type 1 in colorectal cancer liver metastasis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1449-1456.
35. Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, van Krieken JH, Griffioen G, Welvaart K, van de Velde CJ, Verheijen JH, Lamers CB, Verspaget HW. Contribution of plasminogen

- activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes's stage B and C colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997; 75: 1793-1801.
36. Abe J, Urano T, Konno H, Erhan Y, Tanaka T, Nishino N, Takada A, Nakamura S. Larger and more invasive colorectal carcinoma contains larger amounts of plasminogen activator inhibitor type 1 and its relative ratio over urokinase receptor correlates well with tumor size. *Cancer* 1999; 86: 2602-2611.
37. Yang JL, Seetoo DQ, Wang Y, Ranson M, Berney CR, Ham JM, Russel PJ, Crowe PJ. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J Cancer* 2000; 89: 431-439.
38. Sakakibara T, Hibi K, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 799-803.
39. Hirano T, Manabe T, Takeuchi S. Serum cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in cancer patients with remote metastasis. *Cancer Lett* 1993; 70: 31-44.
40. Huber K, Kirchheimer C, Sedlmayer A, Bell C, Ermler D, Binder BR. Clinical value of determination of urokinase-type plasminogen activator antigen in plasma for detection of colorectal cancer: comparison with circulating tumor-associated antigens CA 19-9 and carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1993; 53: 1788-1793.
41. Kos J, Nielsen HJ, Krasovec M, Christensen IJ, Cimerman N, Stephens RW, Brünner N. Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1511-1516.
42. Nielsen HJ, Christensen IJ, Sorensen S, Moesgaard F, Brunner N. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 617-623.
43. Sebdzda T, Saleh Y, Gburek J, Warwas M, Andrzejak R, Siewinski M, Rudnicki J. Total and lipid-bound plasma sialic acid and diagnostic markers in colorectal cancer patients: correlation with cathepsin B expression in progression to Dukes stage. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5: 223-229.
44. Frederick J, Woessner JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.

45. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994; 370: 61-65.
46. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-160.
47. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-1164.
48. Meyer E, Vollmer JY, Bovey R, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65: 4261-4272.
49. Sardinha TC, Noguerras JJ, Xiong H, Weiss EG, Wexner SD, Abrams S. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 389-395.
50. Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, Talieri M. Expression of gelatinase-A (MMP-2) in human colon cancer and normal colon mucosa. *Tumour Biol* 2001; 22: 383-389.
51. Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 758-762.
52. Pesta M, Holubec L, Topolcan O, Cerna M, Rupert K, Holubec LS, Treska V, Kormunda S, Elgrova L, Finek J, Cerny R. Quantitative estimation of matrix metalloproteinase 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res* 2005; 25: 3387-3391.
53. Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 2000; 87: 1215-1221.
54. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; 10: 8229-8234.
55. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, Dano K, Nielsen BS. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 293-302.
56. Kirman I, Jain S, Cekic V, Belizon A, Balik E, Sylla P, Arnell T, Forde KA, Whelan RL. Altered plasma matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of matrix (corrected)

- metalloproteinase-1 concentration during the early postoperative period in patients with colorectal cancer. *Surg Endosc* 2006; 20: 482-486.
57. Islekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE, Füzün M, Küpelioglu A. Matrix metalloproteinase-9, -3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 433-441.
58. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 814-822.
59. von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73.
60. Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Grote D, Hardy N, Boniver J, Belaiche J, Malaise M. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 241-246.
61. Monteleone G, Caruso R, Fina D, Peluso I, Gioia V, Stolfi C, Fantini MC, Caprioli F, Tersigni R, Alessandrini L, MacDonald TT, Pallone F. Control of matrix metalloproteinase production in human intestinal fibroblasts by interleukin 21. *Gut* 2006; 55: 1774-1780.
62. Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: Boon or a baine? *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 97-107.
63. Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S, Vehr AK, Dietrich C, Geier A, Roeb E. Enhanced expression of MMP-7 and MMP 13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1025-1035.
64. Wang YD, Yan PY. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6050-6053.
65. Wang YD, Mao JW. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5926-5932.
66. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Vespaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2960-2966.

67. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 701-709.
68. Medina C, Videla S, Radomiski A, Radomiski MW, Antolin M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A, Malagelda JR. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: 116-122.
69. Gao Q, Meijer MJ, Kubben FJ, Sier CF, Kruidenier L, van Duijn W, van den Berg M, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 584-592.
70. Takahashi M, Ota S, Terano A, Yoshiura K, Matsumura M, Niwa Y, Kawabe T, Nakamura T, Omata M. Hepatocyte growth factor induces mitogenic reactions to the rabbit gastric epithelial cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 528-534.
71. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Kawashima R, Rumi MA, Kazomuri H, Adachi K, Kinoshita Y. Hepatocyte growth factor expression in dextran sodium sulfate induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2275-2285.
72. Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 146-151.
73. Itoh H, Naganuma S, Takeda N, Miyata S, Uchinokura S, Fukushima T, Uchiyama S, Tanaka H, Nagaike K, Shimomura T, Miyazawa K, Yamada G, Kitamura N, Koono M, Kataoka H. Regeneration of injured intestinal mucosa is impaired in hepatocyte growth factor-activator-deficient mice. *Gastroenterology* 2004; 127: 1423-1435.
74. Neuss S, Becher E, Wöltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 2004; 22: 405-414.
75. Oh K, Iimuro M, Takeuchi M, Kaneda Y, Iwasaki T, Terada N, Matsumoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G729-735.

76. Kanbe T, Murai R, Mukoyama T, Murawaki Y, Hashiguchi K, Yoshida Y, Tsuchiya H. Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1517-1525.
77. Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim I, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 551-558.
78. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Nat Acad Sci* 2000; 97: 12103-12108.
79. Urso B, Niesler CU, O'Rahilly S, Siddle K. Comparison of anti-apoptotic signalling by the insulin receptor and IGF-I receptor in preadipocytes and adipocytes. *Cell Signal* 2001; 13: 279-285.
80. Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM, Kahn CR. Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *J Biol Chem* 2002; 277: 31601-31611.
81. Xin X, Hou YT, Li L, Schmiedlin-Ren P, Christman GM, Cheng HL, Bitar KN, Zimmermann EM. IGF-1 increases IGFBP-5 and collagen alpha (I) mRNAs by the MAPK pathway in rat intestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G777-G783.
82. Foulstone E, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, Church D, Hassan AB. Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 2005; 205: 145-153.
83. Han X, Sosnowska D, Bonkowski EL, Denson LA. Growth hormone inhibits signal transducer and activator of transcription 3 activation and reduces disease activity in murine colitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 185-203.
84. Kitamura S, Kondo S, Shimomura Y, Isozaki K, Kanayama S, Higashimoto Y. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2000; 49: 320-324.
85. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 16-26.
86. Gronbaek H, Thogersen T, Frystyk J, Vilstrup H, Flyvbjerg A, Dahlerup JF. Low free and total insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-3 levels in

- chronic inflammatory bowel disease: partial normalization during prednisolone treatment. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 673-678.
87. Kirman I, Whelan RL, Jain S, Nielsen SE, Seidelin JB, Nielsen OH. Insulin-like growth factor binding protein 3 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 780-784.
88. El Yafi F, Winkler R, Delvenne P, Boussif N, Belaiche J, Louis E. Altered expression of type I insuline-like growth factor receptor in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 526-533.
89. Gronbaek H, Eivindson M. Association between the IGF system and inflammatory markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 553-554.
90. Eivindson M, Gronbaek H, Skogstrand K, Thorson P, Frystyk KJ, Flyvberg A, Dahlerup JF. The insulin-like growth factor (IGF) system and its relation to infliximab treatment in adult patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 464-470.
91. Shima I, Sasaguri Y, Kusakawa J, Yamana H, Fujita H, Kakegawa T, Morimatus M. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behaviour of esophageal carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer* 1992; 70: 2747-2753.
92. Yamashita K, Mori M, Shiraishi T, Shibuta K, Sugimachu K. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1169-1174.
93. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrylisin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett' esophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 383-92.
94. Etoh T, Inoue H, Yoshikawa Y, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in esophageal cancer is related to cancer aggressiveness. *Gut* 2000; 47: 50-56.
95. Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. Gelatonolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in esophageal carcinoma: a study using *in situ* zymography. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2164-2170.
96. Samantaray S, Sharma R, Chattapadhyaya TK, Gupta SD, Ralhan R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 37-44.

97. Yamamoto H, Vinitketkumnien A, Adachi Y, Taniguchi H, Hirata T, Miyamoto N, Nosho K, Insumran A, Fujita M, Hosokawa M, Hinoda Y, Imal K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2353-2360.
98. Auvinen MI, Sihvo EI, Ruohtula T, Salminen JT, Koivistoinen A, Sijvola P, Rönholm R, Rämö JO, Bergman M, Salo JA. Incipient angiogenesis in Barrett's epithelium and lymphangiogenesis in Barrett's adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2971-2979.
99. Coles B, Ketterer B. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1990; 25: 47-70.
100. van Lieshout EM, Tiemessen DM, Witteman BJ, Jansen JB, Peters WH. Low glutathione and glutathione S-transferase levels in Barrett's esophagus as compared to normal esophageal epithelium. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 81-85.
101. Brabender J, Lord RV, Wickramasinghe K, Metzger R, Schneider PM, Park JM, Holscher AH, DeMeester TR, Danenberg KD, Danenberg PV. Glutathione-S-transferase-pi expression is downregulated in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 359-367.
102. Cobbe SC, Scobie GC, Pohler E, Hayes JD, Kernohan NM, Dillon JF. Alterations of glutathione S-transferase levels in Barrett's metaplasia compared to normal oesophageal epithelium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 41-47.
103. Ueno H, Hirai T, Nishimoto N, Hihara J, Inoue H, Yoshida K, Yamashita Y, Toge T, Tsubota N. Prediction of lymph node metastasis by p53, p21 (Waf1), and PCNA expression in esophageal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 239-245.
104. Chen H, Wang LD, Guo M, Gao SG, Guo HQ, Fan ZM, Li JL. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 16-21.
105. Kimos MC, Wang S, Borkowski A, Yang CS, Perry K, Olaru A. Esophagin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are biomarkers of human esophageal neoplastic progression. *Int J Cancer* 2004; 111: 415-417.
106. Li LY, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of p53 gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2998-3001.

107. Lörinc E, Jakobson B, Landberg G, Veress B. Ki67 and p53 immunohistochemistry reduces interobserver variation in assessment of Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2005; 46: 642-648.
108. Yoshikawa M, Kato H, Miyazaki T, Nakajima M, Kamiyama Y, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H. Expression of p53 in esophageal carcinoma with multiple areas unstained by iodine. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1444-1447.
109. Parenti A, Leo G, Porzionato A, Zaninotto G, Rosato A, Ninfo V. Expression of survivin, p53m and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis. *Hum Pathol* 2006; 37: 16-22.
110. Merola E, Mattioli E, Minimo C, Zuo W, Rabitti C, Cicala M, Caviglia R, Pollice L, Gabbrielli A, Giordano A, Claudio PP. Immunohistochemical evaluation of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16, p21 (waf-1), p27, and PCNA in Barrett's esophagus. *J Cell Physiol* 2006; 207: 512-519.
111. Merola E, Claudio PP, Giordano A. p53 and the malignant progression of Barrett's esophagus. *J Cell Physiol* 2006; 206: 547-577.
112. Levi S, Goodlad RA, Lee CY, Walport MJ, Wright NA, Hodgson HJ. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and misoprostol on gastroduodenal epithelial proliferation in arthritis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1605-1611.
113. Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996; 110: 1238-1243.
114. Sun WH, Tsuji S, Tsuji M, Gunawan ES, Sawaoka H, Kawai N. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress epithelial cell kinetics and delay gastric wound healing in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 752-761.
115. Kim TI, Lee YC, Lee KH, Han JH, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on Helicobacter pylori-infected gastric mucosae of mice: apoptosis, cell proliferation, and inflammatory activity. *Infect Immun* 2001; 69: 5056-5063.
116. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1994; 269: 15957-15960.
117. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoproteases. *Infect Immun* 1996; 64: 4520-4524.

118. McNeely, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leucocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity *in vitro*. *J Clin Invest* 1995; 96: 456-464.
119. Chattopadhyay A, Gray LR, Patton LL, Caplan DJ, Slade GD, Tien HC, Shugars DC. Salivary secretory leucocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type-1 infected persons. *Infect Immun* 2004; 72: 1956-1963.
120. Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA. Secretory leucocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes. *J Biol Chem* 2002; 277: 29999-30009.
121. Aschroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM. Secretory leucocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* 2000; 6: 1147-1153.
122. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932; 35: 323-332.
123. Turnbull RB, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation on the survival rates. *Ann Surg* 1967; 166: 420-427.
124. Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
125. Grimaudo V, Hauert J, Kruithof EKO. Diurnal variation of the fibrinolytic system. *Thromb Haemostasis* 1988; 59: 495-499.
126. Cassaro M, Rugge M, Tieppo C, Giacomello L, Velo D, Nitti D, Farinati F. Indefinite for non-invasive neoplasia in gastric intestinal metaplasia: the immunophenotype. *J Clin Pathol* 2007; 60: 15-621.
127. Vergara E, Gómez-Morales M, Osuna A, O'Valle F, Aguilar D, Masseroli M, Martinez T, Higuera M, Bravo J, Asensio C, Del Moral RG. Immunohistochemical quantification of leucocyte subsets in the long-term prognosis of kidney transplants. *Transplant Proc* 1998; 30: 2380-2383.
128. Galamb O, Sipos F, Dinya E, Spisak S, Tulassay Z, Molnar B. mRNA expression, functional profiling and multivariate classification of colon biopsy specimen by cDNA overall glass microarray. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6998-7006.
129. Sipos F, Molnár B, Zágoni T, Berczi L, Tulassay Z. Growth in epithelial cell proliferation and apoptosis correlates specifically to the inflammation activity of

- inflammatory bowel disease: ulcerative colitis shows specific p53- and EGFR expression alterations. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 775-86.
130. Wex T, Treiber G, Nilius M, Vieth M, Roesner A, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*-mediated gastritis induces local downregulation of secretory leukocyte protease inhibitor in the antrum. *Infect Immun* 2004; 72: 2383-2385.
131. Wex T, Sokic-Milutinovic A, Todorovic V, Bjelovic M, Milosavljevic T, Pesko P. Down-regulation of secretory leucocyte protease inhibitor expression in gastric mucosa is a general phenomenon in *Helicobacter-pylori* related gastroduodenal diseases. *Dig Dis* 2004; 22: 390-395.
132. Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni R, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. The role of cysteine and serine proteases in colorectal cancer. *Cancer* 1999; 86: 1135-1142.
133. Herszényi L, Farinati F, Plebani M, István G, Sági Z, Carraro P, De Paoli M, Naccarato R, Tulassay Z. A cathepsinek és a plasminogen activator/inhibitor rendszer viselkedése colorectalis carcinomában. *Orv Hetil* 1999; 140: 1833-1836.
134. Cohen AM, Tremitterra S, Candeal F, Thaler HT, Sigurdson ER. Prognosis of node-positive colon cancer. *Cancer* 1991; 67: 1859-1861.
135. Giaretti W, Danova MM, Geido E, Mazzini G, Sciallero S, Aste H. Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1991; 67: 1921-1927.
136. Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R. Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 69: 626-635.
137. Hilska M, Collan YU, Laine VJ, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, Roberts PJ. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2197-2208.
138. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, MacDonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8706-8712.
139. Stelzner S, Hellmich G, Koch R, Ludwig K. Factors predicting survival in stage IV colorectal carcinoma patients after palliative treatment: a multivariate analysis. *J Surg Oncol* 2005; 89: 211-217.
140. Liang H, Wang XN, Wang BG, Pan Y, Liu N, Wang DC, Hao XS. Prognostic factors of young patients with colon cancer after surgery. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1458-1462.

141. Morris M, Platell C, de Boer B, McCaul K, Iacopetta B. Population-based study of prognostic factors in stage II colonic cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 866-871.
142. Morris M, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1413-1417.
143. Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, Guillem JG, Paty PB, Temple LK, Wong WD, Weiser MR. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 503-507.
144. Shiu YC, Lin JK, Huang CJ, Jiang JK, Wang LW, Huang HC, Yang SH. Is C-reactive protein a prognostic factor of colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 443-449.
145. Kattan MW, Gönen M, Jarnagin WR, DeMatteo R, D'Angelica M, Weiser M, Blumgart LH, Fong Y. A nomogram for predicting disease-specific survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 2008; 247: 282-287.
146. Van Noorden CJ, Jonges TG, Van Marle J, Bissell ER, Griffini P, Jans M, Snel J, Smith RE. Heterogeneous suppression of experimentally induced colon cancer metastasis in rat liver lobes by inhibition of extracellular cathepsin B. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 159-167.
147. Ossowski L, Russo-Payne H, Wilson EL. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res* 1991; 51: 274-281.
148. Fazioli F, Blasi F. Urokinase-type plasminogen activator and receptor: new target for anti-metastatic therapy? *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 25-29.
149. Weidle UH, König B. Urokinase receptor antagonists: novel agents for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 1998; 7: 391-403.
150. Wang Y, Liang X, Wu S, Murell GA, Doe WF. Inhibition of colon cancer metastasis by a 3'-end antisense urokinase receptor mRNA in a nude mouse model. *Int J Cancer* 2001; 92: 257-262.
151. Ahmed N, Oliva K, Wang Y, Quinn M, Rice G. Downregulation of urokinase plasminogen activator receptor expression inhibits ERK signalling with concomitant suppression of invasiveness due to loss of uPAR-beta1 integrin complex in colon cancer cells. *Br J Cancer* 2003; 89: 374-384.
152. Li H, Soria C, Griscelli F, Opolon P, Soria J, Yeh P, Legrand C, Vannier JP, Belin D, Perricaudet M, Lu H. Amino-terminal fragment of urokinase inhibits tumor cell

- invasion in vitro and in vivo: respective contribution of the urokinase plasminogen activator receptor-dependent or independent pathway. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1157-1167.
153. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, Rao JS. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280: 36529-36540.
154. Mazzieri R, D'Alessio S, Kenmoe RK, Ossowski L, Blasi F. An uncleavable uPAR allows dissection of signaling pathways in uPA-dependent cell migration. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 367-378.
155. Liu Y, Cao DJ, Sainz IM, Guo YL, Colman RW. The inhibitory effect of Hka in endothelial cell tube formation is mediated by disrupting the uPA-uPAR complex and inhibiting its signaling and internalization. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: 257-267.
156. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 122-136.
157. Hu XW, Duan HF, Gao LH, Pan S, Li YM, Xi Y, Zhao SR, Yin L, Li JF, Chen HP, Wu CT. Inhibition of tumor growth and metastasis by ATF-Fc, an engineered antibody: targeting urokinase receptor. *Cancer Biol Ther* 2008; Jan 28; 7 (5). [Epub ahead of print]; PMID: 18245952.
158. Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonalds JS, Berger AC, Catalano PJ, Haller DG: Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005, 23: 8706-87012.
159. Liang H, Wang XN, Wang BG, Pan Y, Liu N, Wang DC, Hao XS: Prognostic factors of young patients with colon cancer after surgery. *World J Gastroenterol* 2006, 12: 1458-1462.
160. Go VLW, Zamchek N. The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer (Phila.)* 1982; 50: 2618-2623.
161. Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res* 1983; 43: 5489-5492.
162. Northover J. Carcinoembryonic antigen and recurrent colorectal cancer. *Gut* 1986; 27: 117-122.

163. Carriquiry LA, Pineyro A. Should carcinoembryonic antigen be used in the management of patients with colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 921-929.
164. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47: 624-630.
165. Palmqvist R, Engaras B, Lindmark G, Hallmans G, Tavelin B, Nillson O, Hammarström S, Hafström L. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1538-1544.
166. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1346-1349.
167. Morales-Gutierrez V, Vegh I, Colina F, Gomez-Camara A, Ignacio Landa J, Ballesteros D, Carreira PE, Enriquez-De-Salamanca R. Survival of patients with colorectal carcinoma: possible prognostic value of tissular carbohydrate antigen 19.9 determination. *Cancer* 1999; 86: 1675-1681.
168. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Warner U, Lamerz R. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 5195-5198.
169. Bombski G, Gasiorowska A, Orszulak MD, Neneman B, Kotynia J, Strzelczyk J, Janiak A, Malecka-Panas E. Differences in plasma gastrin, CEA, and CA 19-9 concentrations in patients with proximal and distal colorectal cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2002; 31: 155-163.
170. Bombski G, Gasiorowska A, Orszulak MD, Neneman B, Kotynia J, Strzelczyk J, Janiak A, Malecka-Panas E. Elevated plasma gastrin, CEA and CA 19-9 levels decrease after colorectal cancer resection. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 148-152.
171. Takahashi Y, Mai M, Nakazato H. Preoperative CEA and PPD values as prognostic factors for immunochemotherapy using PSK and 5-FU. *Anticancer Res* 2005; 25: 1377-1384.
172. Safi F, Roscher R, Bittner R, Beger HG. The clinical relevance of tumor marker CEA, CA 19-9 in regional chemotherapy for hepatic metastases of colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 1988; 3: 101-106.

173. Louhimo J, Carpelan-Holmström M, Alfthan H, Stenman UH, Jarvinen HJ, Haglund C. Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 101: 545-548.
174. Herszényi L, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár DL, Hritz I, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z. The tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 194. /DOI10.1186/1471-2407-8-194/.
175. De Bruin PAF, Griffioen G, Verspaget HW, Verheijen JH, Lamers CBHW. Plasminogen activators and tumor development in the human colon: activity levels in normal mucosa, adenomatous polyps and adenocarcinomas. *Cancer Res* 1987; 47: 4654-4657.
176. Desch CE, Benson AB, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD, Pfister DG, Virgo KS, Petrelli NJ; American Society of Clinical Oncology. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8512-8519.
177. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdoland JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-5327.
178. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O. Tumor markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1348-1360.
179. Ebert MP, Krüger S, Fogeron ML, Chen J, Pross M, Schulz HU, Lage H, Heim S, Roessner A, Malfertheiner P, Röcken C. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 1693-1704.
180. Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Carroccio A, Ippolito S, Gebbia N. Lysosomal aspartic and cysteine proteinases serum levels in patients with pancreatic cancer or pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14: 22-27.
181. Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Gebbia N. Lysosomal cathepsin B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology* 1997; 54: 79-83.

182. Song KS, Lee A, Choi JR, Kwon OH. Diagnostic efficacy of plasma urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 in differentiation of hepatocellular carcinoma from cirrhosis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 864-867.
183. Herszényi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Foschia F, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases. *Clinica Chimica Acta* 2000; 291: 171-187.
184. Herszényi L, István G, Cardin R, De Paoli M, Plebanio M, Tulassay Z, Farinati F. Serum cathepsin B and plasma urokinase-type plasminogen activator levels in gastrointestinal tract cancers. *Eur J Cancer Prev* 2008 2008; 17 (5): 438-445.
185. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K. Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54: 147-157.
186. Grebenchtchikov N, Maguire TM, Riisbro R, Geurts-Moespot A, O'Donovan N, Shmitt M, McGreal G, MdDermott E, O'Higgins N, Brünner N, Sweep CG, Duffy MJ. Measurement of plasminogen activator system components in plasma and tumor tissue extracts obtained from patients with breast cancer: an EORTC receptor and biomarker group collaboration. *Oncol Rep* 2005; 14: 235-239.
187. Pappot H, Hoyer-Hansen G, Ronne E, Hansen HH, Brunner NM, Dano K, Grondahl-Hansen J. Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 1997; 33: 867-872.
188. Abendstein B, Daxenbichler G, Windbichler G, Zeimet AG, Geurts A, Sweep F, Marth C. Predictive value of uPA, PAI-1, HER-2 and VEGF in the serum of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2000; 20: 569-572.
189. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Arakawa S, Kaminodono S. Elevation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor densities as new predictors of disease progression and prognosis in men with prostate cancer. *Int J Oncol* 1999; 14: 535-542.
190. Juarranz M, Calle-Puron ME, Gonzales-Navarro A, Regidor-Poyatos E, Soriano T, Martinez-Hernandez D, Rojas VD, Guince VF. Physical exercise, use of *Plantago ovata* and aspirin, and reduced risk of colon cancer. *Eur J Cancer Prev* 2002; 11: 465-472.
191. Gondal G, Grotmol T, Hofstad B, Bretthauer M, Eide TJ, Hoff G. Lifestyle-related risk factors and chemoprevention for colorectal neoplasia: experience from the large-scale NORCCAP screening trial. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 373-379.

192. Malila N, Virtanen MJ, Virtamo J, Albanes D, Pukkala E (2006). Cancer incidence in a cohort of Finnish male smokers. *Eur J Cancer Prev* 2006; 15: 103-107.
193. Herszényi L, Farinati F, Miheller P, Tulassay Z. Chemoprevention of colorectal cancer: feasibility in the every day practice? *Eur J Cancer Prev* 2008 (elfogadva, *in press*).
194. Jonkers D, Ernst J, Pladdet J, Stockbrügger R, Hameeteman W. Endoscopic follow-up of 383 patients with colorectal adenoma: an observational study in daily practice. *Eur J Cancer Prev* 2006; 15: 202-210.
195. Matarese VG, Feo CV, Pezzoli A, Trevisani L, Brancaleoni M, Gullini S. Colonoscopy surveillance in asymptomatic subjects with increased risk for colorectal cancer: clinical evaluation and cost analysis of an Italian experience. *Eur J Cancer Prev* 2007; 16: 292-297.
196. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer; American Cancer Society. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006; 130: 1872-1885.
197. Rundle AG, Lebowitz B, Vogel R, Levine S, Neugut AI. Colonoscopic screening in average-risk individuals ages 40 to 49 vs 50 to 59 years. *Gastroenterology* 2008; 134: 1311-1315.
198. Herszényi L, Budai A, Döbrössy L, Kovács A, Tulassay Z. A vastagbélrákszűrés újabb szempontjai. *Magy Belorv Arch* 2008; 61: 7-12.
199. Yeoh KG. How do we improve outcomes for gastric cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 970-972.
200. Dan YY, So JB, Yeoh KG. Endoscopic screening for gastric cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 4: 709-716.
201. Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relationship between matrix metalloproteinase expression and tumor angiogenesis in human breast carcinoma. *Oncol Res* 1998; 5: 673-677.
202. Radisky DC, Przybylo JA. Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 316-322.
203. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, Macchia V. Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinase 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep* 2006; 15: 1321-1326.

204. Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 413-417.
205. Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Kusumoto H, Haraguchi M, Ueo H, Akiyoshi T. Analysis of MT1-MMP and MMP-2 expression in human gastric cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 316-322.
206. Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, Kavatsas N, Tiniakos D, Karakosta A, Tzanakis N, Peros G. The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 2008; 28: 1875-1881.
207. Wu LM, Zhang F, Xie HY, Xu X, Chen QX, Yin SY, Liu XC, Zhou L, Xu XB, Sun YL, Zheng SS. MMP2 promoter polymorphism (C-1306T) and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after transplantation. *Clin Genet* 2008; 73: 273-278.
208. Karadag A, Fedarko NS, Fisher LW. Dentin matrix protein 1 enhances invasion potential of colon cancer cells by bridging matrix metalloproteinase-9 to integrins and CD44. *Cancer Res* 2005; 65: 11545-11552.
209. Mori M, Bernard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinoma. *Cancer* 1995; 75: 1516-1519.
210. Ghilardi G, Biondi ML, Erario M, Guagnellini E, Scotza R. Colorectal carcinoma susceptibility and metastases are associated with matrix metalloproteinase-7 promoter polymorphisms. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 1940-1941.
211. Herszényi L, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Hritz I, Miheller P, Berczi L, Molnár B, Tulassay Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 31-37.
212. Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993; 142: 359-365.
213. Saito K, Takeha S, Shiba K, Matsuno S, Sorsa T, Nagura H, Ohtani H. Clinicopathologic significance of urokinase receptor- and MMP-9 positive stromal

- cells in human colorectal cancer: functional multiplicity of matrix degradation on hematogeneous metastasis. *Int J Cancer* 2000; 86: 24-29.
214. Collins HM, Morris TM, Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane-type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 2001; 84: 1664-1670.
215. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma: differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001; 92: 2680-2691.
216. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJF. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1705: 69-89.
217. Kim TD, Song KS, Li G, Choi H, Park HD, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 211; DOI: 10.1186/1471-2407/6/211.
218. Harada K, Hiraoka S, Kato J, Horri J, Fujita H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Genetic and epigenetic alterations of Ras signalling pathway in colorectal neoplasia: analysis based on tumour clinicopathological features. *Br J Cancer* 2007; 97: 1425-1431.
219. Hashimoto K, Shimizu Y, Suehiro Y, Okayama N, Hashimoto S, Okada T, Hiura M, Ueno K. Hypermethylation status of APC inversely correlates with the presence of submucosal invasion in laterally spreading colorectal tumors. *Mol Carcinog* 2008; 47: 1-8.
220. Model F, Osborn N, Ahlquist D, Gruetzmann R, Molnar B, Sipos F, Galamb O, Pilarski C, Saeger HD, Tulassay Z, Hale K, Mooney S, Lograsso J, Adorjan P, Lesche R. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 153-163.
221. Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OH, Sorensen S, Overgaard J, Lilja H, Harris A, Murphy G, Brünner N. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 156-164.
222. Pesta M, Topolcan O, Holubec L Jr, Rupert K, Cerna M, Holubec LS, Treska V, Finek J, Cerny R. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the

- matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Research* 2007; 27: 1863-1867.
223. Frederiksen C, Lykke J, Christensen IJ, Brünner N, Nielsen HJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in plasma from tumour arteries and veins of patients with rectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 545-52.
224. Langers AMJ, Sier CFM, Hawinkels LJAC, Kubben FJGM, van Duijn W, van der Reijden JJ, Lamers CBHW, Hommes DW, Verspaget HW. MMP-2 geno-phenotype is prognostic for colorectal cancer survival, whereas MMP-9 is not. *Br J Cancer* 2008; 98: 1820-1823.
225. Ogata Y, Matono K, Sasatomi T, Ishibashi N, Ohkita A, Mizobe T, Ogo S, Ikeda S, Ozasa H, Shirouzu K. The MMP-9 expression determined the efficacy of postoperative adjuvant chemotherapy using oral fluoropyrimidines in stage II or III colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 57: 577-583.
226. Sorensen NM, Byström P, Christensen IJ, Berglund A, Nielsen HJ, Brünner N, Glimelius B. TIMP-1 is significantly associated with objective response and survival in metastatic colorectal cancer patients receiving combination of irinotecan, 5-fluorouracil, and folinic acid. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4117-4122.
227. Ogata Y, Matono K, Nakijima M, Sasatomi T, Mizobe T, Nagase H, Shirouzu K. Efficacy of the MMP-inhibitor MMI270 against lung metastasis following removal of orthotopically transplanted human colon cancer in rat. *Int J Cancer* 2006; 118: 215-221.
228. Anderson I, Shipp MA, Docherty AJP, Teicher BA. Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agents reduces local invasion and metastasis of Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2087-2091.
229. Giavazzi R, Garofalo A, Feri C, Lucchini V, Bone EA, Chiari S, Brown PD, Nicoletti MI, Taraboletti G. Batimastat, synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarium carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 985-992.
230. Yoon WH, Jung YJ, Kim TD, Li G, Park BJ, Kim JY, Lee YC, Kim JM, Park JI, Park HD, No ZS, Lim K, Hwang BD, Kim YS. Gabexate Mesilate inhibits colon cancer growth, invasion and metastasis by reducing matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4517-4526.
231. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer-Trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-2392.

232. Vihinen P, Ala-Aho R, Kahari VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 203-220.
233. Lubbe WJ, Zhou ZY, Fu W, Zuzga D, Schulz S, Fridman R, Muschel RJ, Waldman SA, Pitari GM. Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1876-1882.
234. Pavlaki M, Zucker S. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 177-203.
235. van Smarle S, van Vliet A, Sollie F, Kambayashi Y, Yamada-Sawada T. Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral S-3304, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, in single and multiple dose escalation studies in healthy volunteers. *Int J Pharmacol Ther* 2005; 43: 282-293.
236. Chiappori AA, Eckhardt SG, Bukowski R, Sullivan DM, Ikeda M, Yano Y, Yamada-Sawada T, Kambayashi Y, Tanaka K, Javle MM, Mekhail T, O'Bryant CL, Creavan PJ. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of s-3304, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2091-2099.
237. Kucharzik T, Maaser C, Luger A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1068-1083.
238. Herszényi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2007; 25: 267-269.
239. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 378-389.
240. Sipos F, Galamb O, Herszényi L, Molnár B, Solymosi N, Zágoni T, Berczi L, Tulassay Z. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor, hepatocyte growth factor receptor and telomerase protein expression in mild ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2007; 43: 289-298.
241. Herszényi L, Sipos F, Molnár B, Galamb O, Solymosi N, Berczi L, Juhász M, Miheller P, Tulassay Z. A mátrix metalloproteináz-9 expressziója colitis ulcerosában. *Magy Belorv Arch* 2008; (elfogadva, *in press*).
242. Warner EE, Dieckgraefe BK. Application of genome-wide gene expression profiling by high-density DNA arrays to the treatment and study of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 140-157.

243. de Buhr MF, Mahler M, Geffers R, Hansen W, Westendorf AM, Lauber J, Buer J, Schlegelberger B, Hedrich HJ, Bleich A. Cd14, Gbp1, and Pla2g2a: three major candidate genes for experimental IBD identified by combining QTL and microarray analyses. *Physiol Genomics* 2006; 25: 426-434.
244. Cowdhury A, Fukuda R, Fukumoto S. Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa from ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 1996; 31: 353-360.
245. Zeeh JM, Ennes HS, Hoffmann P, Procaccino F, Eysselein VE, Snape WJ, McRoberts JA. Expression of insulin-like growth factor I receptors and binding proteins by colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 272: 481-487.
246. Miheller P, Müzes G, Rác K, Blázovits A, Lakatos P, Herszényi L, Tulassay Z. Changes of OPG and RANKL concentrations in Crohn's disease after infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1379-1384.
247. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Duijn W, van der Zon AM, Hanemaaijer R, Verheijen JH, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Effect of the tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase-proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 200-10.
248. Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, Rovedatti L, Docena G, Monteleone G, Rampton DS, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology* 2007; 133: 137-149.
249. Kobayashi K, Arimura Y, Goto A, Okahara S, Endo T, Shinomura Y, Imai K. Therapeutic implications of the specific inhibition of causative matrix metalloproteinases in experimental colitis induced by dextran sulphat sodium. *J Pathol* 2006; 209: 376-383.
250. Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005; 40: 925-931.
251. Shaheen NJ. Advances in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 1554-1566.
252. Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C. Barrett's metaplasia. *Lancet* 2000; 356: 2079-2085.
253. Kim R, Weissfeld JL, Reynolds JC, Kuller LH. Etiology of Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 369-377.

254. Olliver JR, Hardie LJ, Gong Y, Dexter S, Chalmers D, Harris KM, Wild CP. Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 620-625.
255. Wong A, Fitzgerald RC. Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1-10.
256. Jankowski JA, Anderson M. Review article: management of oesophageal adenocarcinoma-control of acid, bile and inflammation in intervention strategies for Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (suppl 5): 71-80.
257. Theisen J, Nigro JJ, DeMeester TR, Peters JH, Gastal OL, Hagen JA, Hashemi M, Bremner CG. Chronology of Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Dis Esophagus* 2004; 17: 67-70.
258. Herszényi L, Hritz I, Pregun I, Sipos F, Juhasz M, Molnar B, Tulassay Z. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 676-82.
259. Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer. *The Oncologist* 2005; 10: 590-601.
260. Heath EI, Burtness BA, Kleinberg L, Salem RR, Yang SC, Heitmiller RF, Canto MI, Knisely JP, Topazian M, Montgomery E, Tsottles N, Pithavala Y, Rohmiller B, Collier M, Forastiere AA. Phase II, parallel-design study of preoperative combined modality therapy and the matrix metalloprotease (MMP) inhibitor prinomastat in patients with esophageal adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 2006; 24: 135-140.
261. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, Allegra CJ, Johnston PG. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75: 423-429.
262. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-520.
263. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993; 105: 119-129.
264. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-1174.

265. Ramel S, Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS, Neshat K, Haggitt RC, Dean PJ, Thor K, Rabinovitch PS. Evaluation of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. *Gastroenterology* 1992; 102: 1220-1228.
266. Wang DY, Xiang YY, Tanaka M, Li XR, Li JL, Shen Q, Sugimura H, KIno I. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer* 1994; 74: 3089-3096.
267. Slade N, Moll UM. Mutational analysis of p53 in human tumors: immunocytochemistry. *Methods Mol Biol* 2003; 234: 231-243.
268. Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Benhattar J, Fontelliet C. p53 gene mutation and protein accumulation during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Mod Pathol* 2001; 14: 397-403.
269. Geboes K, Van Eyken P. The diagnosis of dysplasia and malignancy in Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2000; 37: 99-107.
270. Polkowski W, van Lanschot JJ, Ten Kate FJ, Baak JP, Tytgat GN, Obertop H, Voorn WJ, Offerhaus GJ. The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.
271. Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K, Dittler HJ, Cleary KR, Troster M, Siewert JR, Roth JA. Mutations of p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study of 98 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111: 323-331.
272. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and CerbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2453-2462.
273. Hritz I, Györffy H, Molnár B, Lakatos G, Sipos F, Pregun I, Juhász M, Prónai L, Schaff Z, Tulassay Z, Herszényi L. Increased p53 expression in the malignant transformation of Barrett's esophagus is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment. *Pathol Oncol Res* 2008; (elfogadva, *in press*).
274. Herszényi L, Tulassay Z. A nem szteroid gyulladáscsökkentő kezelés felső tápcsatornai mellékhatásainak gyógyszeres megelőzése. *LAM* 2005; 15 (Suppl. 1): 15-20.
275. Herszényi L. A nem szteroid gyulladáscsökkentő okozta gastropathia. A megelőzés újabb szempontjai. *LAM* 2007; 17: 275-180.

276. Herszényi L. A nem szteroid gyulladásgátló szerek okozta vékonybélkárosodások. *LAM* 2008; 18: 399-400.
277. Laine L, Wogen J, Yu H. Gastrointestinal health care resource utilization with chronic use of COX-2-specific inhibitors versus traditional NSAIDs. *Gastroenterology* 2003; 152: 389-395.
278. Laine L, Smith R, Min K, Chen C, Dubois RW. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroid anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 751-767.
279. Lanas A. Improving on our goal to reduce NSAID-induced GI complications: a challenging task? *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1104-1105.
280. Fitzgerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors for cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001; 345: 433-442.
281. Wolfe F, Anderson J, Burke TA, Arguelles LM, Pettitt D. Gastroprotective therapy and risk of gastrointestinal ulcers: risk reduction by COX-2 therapy. *J Rheumatol* 2002; 29: 467-473.
282. Prónai L, Hritz I, Molnár B, Herszényi L, Tulassay Z. COX-2 selective inhibitors (COXIBs): gastrointestinal safety. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16: 22-30.
283. Lakatos G, Herszényi L, Tulassay Z. The safety of COX-2 inhibitors. *Orv Hetil* 2008; 149: 1539-1547.
284. Rostom A, Muir K, Dubé C, Jolicoeur E, Boucher M, Joyce J, Tugwell P, Wells GW. Gastrointestinal safety of cyclooxygenase-2 inhibitors: a Cochrane Collaboration systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 818-828.
285. Goldstein JL, Eisen GM, Lewis B, Gralnek IM, Aisenberg J, Bhadra P, Berger MF. Small bowel mucosal injury is reduced in healthy subjects treated with celecoxib compared with ibuprofen plus omeprazole, as assessed by video capsule endoscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 1211-1222.
286. Hawkey CJ, Weinstein WM, Stricker K, Murphy V, Richard D, Krammer G, Rebuli R. Clinical trial: comparison of the gastrointestinal safety of lumiracoxib with traditional nonselective anti-inflammatory drugs early after the initiation of treatment – findings from the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 838-845.
287. Hritz I, Herszényi L, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. Proton pump inhibitor co-therapy normalizes the increased cell turnover of the gastric mucosa both in NSAID and selective COX-2 users. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 75-84.

288. Hritz I, Herszényi L, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. A protonpumpagátlók hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára tartós nem szteroid gyulladásgátló kezelés során. *LAM* 2007; 17: 802-803.
289. Sant SM, Cahill RJ, Gilvarry J, O'Morain CA. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs have an effect on gastric cell turnover? *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 575-579.
290. Zhu GH, Yang XL, Lai KC, Ching CK, Wong BC, Yuen ST, Ho J, Lam SK. Nonsteroidal antiinflammatory drugs could reverse Helicobacter pylori-induced apoptosis and proliferation in gastric epithelial cells. *Dig Dis* 1998; 43: 1957-1963.
291. Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis un human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-5772.
292. Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H. Increased expression of epiderml growth factor receptor durign gastric ucler healing in rats. *Gastroenterology* 1992; 102: 695-698.
293. Imatani A, Sasano H, Yabuki N, Kato K, Ohara S, Asaki S, Toyota T. In situ analysis of tissue dynamics and p53expression in human gastric mucosa. *J Pathol* 1996; 179: 39-42.
294. Szabo I, Tarnawski A. Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 3-15.
295. Abe S, Sasano H, Katoh K, Ohara S, Arikawa T, Noguchi T, Sasaki S, Yasui W, Tahara E, Nogura H, Toyota T. Immunohistochemical studies on EGF family growth factors in normal and uclerated human gastric mucosa. *Dig Dis* 1997; 42: 1199-1209.
296. Kakei N, Ichinose M, Tatematus M, Shimizu M, Oka M, Yahagi N, Matsushima M, Kurokawa K, Yonezawa S, Furihata C. Effects of long-term omeprazole treatment on adult rat gastric mucosa-enhancement of the epithelial cell proliferation and suppression of its differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 861-868.
297. Gray MR, Darnton SJ, Hunt JA, Irlam RW, Nemeth J, Wallace HM. Accelerated gastric epithelil proliferation. *Gut* 1995; 36: 522-527.
298. Biasco G, Mordenti P, Brandi G, Paganelli GM, Santuci R, Miglioli M. Cell kinetics of the gastric mucosa of patients treated with omeprazole. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 621-622.
299. Li H, Helander HF. Parietal cell kinetics after administration of omeprazole and ranitidine in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 205-209.

300. Klinkenberg-Knol EC, Nelis F, Dent J, Snel P, Michell B, Prichard P, Lloyd D, Havu N, Frame MH, Roman J, Walan A. Long-term omeprazole treatment in resistant gastroesophageal reflux disease: efficacy, safety, and influence on gastric mucosa. *Gastroenterology* 2000; 118: 661-669.
301. Hritz I, Herszényi L, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and EGFR expression and has no effect on apoptosis and p53 expression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4721-4726.
302. Hritz I, Herszényi L, Molnár B, Prónai L, Tulassay Z. A gyomornyálkahártya-sejtek életciklusa protonpumpagátló kezelés során. *Magy Belorv Arch* 2006; 61: 187-191.
303. Vieth M, Kulig M, Leodolter A, Naucler E, Jaspersen D, Labenz J, Meyer-Sabellek W, Lind T, Willich S, Malfertheiner P, Stolte M. Histological effects of esomeprazole therapy on the squamous epithelium of the distal oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 313-319.
304. Boparai V, Rajagopalan J, Triadafilopoulos G. Guide to use of proton pump inhibitors in adult patients. *Drugs* 2008; 68: 925-947.
305. Tolia V, Boyer K. Long-term proton pump inhibitor use in children: a retrospective review of safety. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 385-393.
306. Coté GA, Howden CW. Potential adverse effects of proton pump inhibitors. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 208-214.
307. Wex T, Treiber G, Nilus M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P. Helicobacter pylori-mediated gastritis induces local down-regulation of secretory leucocyte protease inhibitor in the antrum. *Infect Immun* 2004; 72: 2383-2385.
308. Wex T, Sokic-Milutinovic A, Todorovic V, Bjelovic M, Milosavljevic T, Pesko P, Malfertheiner P. Down-regulation of secretory leucocyte protease inhibitor expression in gastric mucosa is a general phenomenon in Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases. *Dig Dis* 2004; 22: 39-395.
309. Hritz I, Kuester D, Vieth M, Herszényi L, Stolte M, Roessner A, Tulassay Z, Wex T, Malfertheiner P. Secretory Leucocyte Protease inhibitor expression in various types of gastritis - a specific role of H. pylori infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 277-282.
310. Wex T, Treiber G, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P. Helicobacter pylori infection, but not low-dose aspirin, results in a local reduction of the secretory leucocyte protease inhibitor in gastroduodenal mucosa. *Helicobacter* 2006; 11: 31-38.

311. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ascroft GS, Wahl SM, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wright CD, Ding A. Conversion of proepithelin to epithelin to epithelia's: role of SLPI and elastase in host defence and wound repair. *Cell* 2002; 111: 867-878.
312. Lentsch AB, Jordan JA, Czermak BJ, Diehl KM, Younkin EM, Sarma V, Ward PA. Inhibition of NF-kappaB activation and augmentation of Ikappa Bbeta by secretory leukocyte protease inhibitor during lung inflammation. *Am J Pathol* 1999; 154: 239-247.
313. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. Secretory leucoprotease inhibitor prevents LPS-induced Ikappa B alpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem* 2002; 277: 33648-33653.
314. Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ, Sallenave JM. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2891-2905.

7. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE (a PhD. értekezés óta) (1998-2008)

7.1. Értekezéshez kapcsolódó angol nyelvű publikációk (IF: 29.965)

1. **Herszényi L**, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni R, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. The role of cysteine and serine proteases in colorectal cancer.
Cancer 1999; 86: 1135-1142. IF: 3.632
2. **Herszényi L**, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Foschia F, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases.
Clinica Chimica Acta 2000; 291: 171-187. IF: 1.041
3. Prónai L, Hritz I, Molnár B, **Herszényi L**, Tulassay Z. COX-2 selective inhibitors (COXIBs): gastrointestinal safety.
Int J Immunopathol Pharmacol 2003; 16: 22-30. IF: 3.927
4. Juhász M, **Herszényi L**, Tulassay Z, Malfertheiner P, Ebert MP. Helicobacter pylori and molecular mechanisms of gastric carcinogenesis: targets for prevention and therapy.
Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4: 97-103.
5. Hritz I, **Herszényi L**, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. Proton pump inhibitor co-therapy normalizes the increased cell turnover of the gastric mucosa both in NSAID and selective COX-2 users.
Int J Immunopathol Pharmacol 2005; 18: 75-84. IF: 3.418
6. Hritz I, **Herszényi L**, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and EGFR expression and has no effect on apoptosis and p53 expression.
World J Gastroenterol 2005; 11(30): 4721-4726.
7. Hritz I, Kuester D, Vieth M, **Herszényi L**, Stolte M, Rossner A, Tulassay Z, Wex T, Malfertheiner P. Secretory Leucocyte Protease inhibitor expression in various types of gastritis - a specific role of H. pylori infection.
Eur J Gastroenterol Hepatol 2006; 18: 277-282. IF: 1.895
8. **Herszényi L**, Hritz I, Pregun I, Sipos F, Juhasz M, Molnar B, Tulassay Z. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis.
World J Gastroenterol 2007; 13: 676-82.
9. **Herszényi L**, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease.
Dig Dis 2007; 25: 267-269. IF: 1.072

10. Sipos F, Galamb O, **Herszényi L**, Molnár B, Solymosi N, Zágoni T, Berczi L, Tulassay Z. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor, hepatocyte growth factor receptor and telomerase protein expression in mild ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2007; 43(3): 289-298. IF: 1.758
11. Miheller P, Müzes G, Rác K, Blázovits A, Lakatos P, **Herszényi L**, Tulassay Z. Changes of OPG and RANKL concentrations in Crohn's disease after infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1379-1384. IF: 4.705
12. **Herszényi L**, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Hritz I, Miheller P, Berczi L, Molnár B, Tulassay Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 31-37. IF: 1.272
13. **Herszényi L**, Farinati F, Miheller P, Tulassay Z. Chemoprevention of colorectal cancer: feasibility in the every day practice? *Eur J Cancer Prev* 2008; (elfogadva, *in press*). IF: 1.632
14. **Herszényi L**, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár DL, Hritz I, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z. The tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 194. /DOI10.1186/1471-2407-8-194/. IF: 2.709
15. **Herszényi L**, István G, Cardin R, De Paoli M, Plebani M, Tulassay Z, Farinati F. Serum cathepsin B and plasma urokinase-type plasminogen activator levels in gastrointestinal tract cancers. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17 (5): 438-445. IF: 1.632
16. Hritz I, Györffy H, Molnár B, Lakatos G, Sipos F, Pregun I, Juhász M, Prónai L, Schaff Z, Tulassay Z, **Herszényi L**. Increased p53 expression in the malignant transformation of Barrett's esophagus is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment. *Pathol Oncol Res* 2008; Aug. 28 (Epub ahead of Print) IF: 1.272

7.2. Értekezéshez kapcsolódó magyar nyelvű publikációk

1. **Herszényi L**. A gyomorrák új prognosztikus tényezői. *Orv Hetil* 1999; 32: 1771-1077.
2. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, István G, Sági Z, Carraro P, De Paoli M, Naccarato R, Tulassay Z. A cathepsinek és a plasminogen activator/inhibitor rendszer viselkedése colorectalis carcinomában. *Orv Hetil* 1999; 33: 1833-1836.
3. **Herszényi L**, Tulassay Z. A protonpumpa gátlók összehasonlító vizsgálata. *Orv Hetil* 2001; 36: 1953-1961.

4. **Herszényi L**, Juhász M, Tulassay Z. A funkcionális dyspepsia kezelésének újabb szempontjai.
Orv Hetil 2004; 145: 747-754.
5. **Herszényi L**, Juhász M, Prónai L, Tulassay Z. A vastagbélrák kemoprofilaxisa.
Orv Hetil 2004; 145: 603-610.
6. Juhász M, Vértesaljai M, **Herszényi L**, Malfertheiner P, Ebert MP. A caveolin-1 gén szerepe a carcinogenesisben.
Orv Hetil 2004; 145: 1985-1989.
7. **Herszényi L**, Tulassay Z. A nem szteroid gyulladáscsökkentő kezelés felső tápcsatornai mellékhatásainak gyógyszeres megelőzése.
LAM 2005; 15 (Suppl. 1): 15-20.
8. **Herszényi L**, Miheller P, Tulassay Z. A gyulladós bélbetegség biológiai kezelésének újabb szempontjai.
Orvostovábbképző Szemle 2005; 6: 13-17.
9. Hritz I, **Herszényi L**, Molnár B, Prónai L, Tulassay Z. A gyomornyálkahártya-sejtek életciklusa protonpumpagátló kezelés során.
Magy Belorv Arch 2006; 61: 187-191.
10. Miheller P, **Herszényi L**, Múzes Gy, Tulassay Z. Gyulladós bélbetegségek biológiai kezelése.
Magy Belorv Arch 2006; 61: 155-166.
11. **Herszényi L**. Colorectalis tumorok szűrése.
Magy Belorv Arch 2007; (suppl. 3): 193-195.
12. Lakatos G, **Herszényi L**, Miheller P, Tulassay Z. A gyulladós bélbetegségek patogenezise.
Magy Belorv Arch 2007; 62: 31-40.
13. **Herszényi L**. A nem szteroid gyulladáscsökkentő okozta gastropathia. A megelőzés újabb szempontjai.
LAM 2007; 17: 275-280.
14. Hritz I, **Herszényi L**, Molnár B, Tulassay Z, Prónai L. A protonpumpagátlók hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára tartós nem szteroid gyulladásgátló kezelés során.
LAM 2007; 17(11): 802-803.
15. **Herszényi L**, Budai A, Döbrössy L, Kovács A, Tulassay Z. A vastagbélrákszűrés újabb szempontjai.
Magy Belorv Arch 2008; 61: 7-12.
16. **Herszényi L**. Rákszűrés és daganatmegelőzés gyulladós bélbetegségekben.
Magy Belorv Arch 2008; (suppl. 1): 88-89.

17. **Herszényi L.** A nem szteroid gyulladásgátló szerek okozta vékonybélkárosodások. *LAM* 2008; 18: 399-400.
18. Lakatos G, **Herszényi L**, Tulassay Z. A COX-2 gátlók biztonságossága. *Orv Hetil* 2008; 149: 1539-1547.
19. **Herszényi L**, Sipos F, Molnár B, Galamb O, Solymosi N, Berczi L, Juhász M, Miheller P, Tulassay Z. A mátrix metalloproteináz-9 expressziója colitis ulcerosában. *Magy Belorv Arch* 2008; (elfogadva, *in press*).

7.3. Értekezéshez kapcsolódó angol nyelvű idézhető abstractok

1. **Herszényi L**, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. Cysteine and serine proteases in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 114: A 610.
2. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, István G, Sápi Z, Naccarato R, Tulassay Z. The role of cathepsins and plasminogen activator system in colorectal cancer. *Z Gastroenterol* 1998; 36: 415-416, A40.
3. **Herszényi L**, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, Cardin R, Tulassay Z, Naccarato R, Farinati F. The behaviour of cathepsins and plasminogen activation system in colorectal cancer. *Digestion* 1998; 59 (suppl 3): 1-757.
4. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, István G, Sápi Z, Carraro P, De Paoli M, Naccarato R, Tulassay Z. The role of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999; 115: A 791.
5. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, Carraro P, István G, Sápi Z, De Paoli M, Naccarato R, Tulassay Z. Urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer. *Z Gastroenterol* 1999; 37: 403-458; A 73.
6. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Roveroni G, István G, Sápi Z, Naccarato R, Tulassay Z. The behaviour of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer. *Gut* 1999; 45 (suppl V): A 243.
7. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, István G, Carraro P, De Paoli M, Sápi Z, Cardin R, Naccarato R, Tulassay Z. The prognostic impact of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: A 511.

8. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, István G, Carraro P, De Paoli M, Sápi Z, Cardin R, Naccarato R, Tulassay Z. The prognostic role of urokinase type plasminogen activator receptor in colorectal cancer.
Z Gastroenterol 2000; 38: 397-431, A 40.
9. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, István G, Carraro P, De Paoli M, Sápi Z, Cardin R, Naccarato R, Tulassay Z. Urokinase type plasminogen activator receptor: a new prognostic factor in colorectal cancer.
Gut 2000; 47 (suppl III): A 264.
10. **Herszényi L**, Farinati F, István G, De Paoli M, Roveroni G, Plebani, Naccarato R, Tulassay Z. Urokinase type plasminogen activator and inhibitor type-1 plasma levels in colorectal cancer.
Gastroenterology 2001; 120: A 599.
11. **Herszényi L**, Farinati F, István G, De Paoli M, Roveroni G, Plebani M, Naccarato R, Tulassay Z. The tumor marker impact of PAI-1 and UPA in colorectal cancer.
Gastroenterology 2002; 122: A 486.
12. **Herszényi L**, Sipos F, Galamb O, Prónai L, Juhász M, Hritz I, Molnár B, Tulassay Z. mRNA expression array data correlates to the MMP-9 protein expression in colorectal biopsies.
Z Gastroenterol 2004; 42 /suppl/: A 415.
13. Hritz I, Molnár B, **Herszényi L**, Tulassay Z, Prónai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and EGFR expression and has no effect on apoptosis and p53 expression.
Z Gastroenterol 2004; 42 /suppl/: A 416.
14. **Herszényi L**, Hritz I, Molnár B, Prónai L, Tulassay Z. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions in the reflux esophagitis-Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the esophagus.
Gastroenterology 2005; 128: A 162.
15. Hritz I, **Herszényi L**, Molnár B, Tulassay Z. Alterations of proliferating cell nuclear antigen and p53 expressions in the reflux esophagitis-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the esophagus.
Z Gastroenterol 2005; 43: 477-529; A 51.
16. **Herszényi L**, Hritz I, Molnár B, Tulassay Z. Alterations of MMP-9 and glutathione-S-transferase expression in the esophagitis-Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the esophagus.
Z Gastroenterol 2005; 43: 477-529; A 42.
17. **Herszényi L**, Sipos F, Galamb O, Hritz I, Pregun I, Molnár B, Tulassay Z. Alterations of matrix metalloproteinase-9, hepatocyte growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor-1 expressions in ulcerative colitis.
Gastroenterology 2006; 130 (4) (Suppl. 2): A 488.

18. **Herszényi L**, Sipos F, Galamb O, Hritz I, Molnár B, Tulassay Z. Correlation between matrix metalloproteinase-9 immunohistochemistry and mRNS expression arra results in colorectal cancer.
Annals of Oncology 2006; 17 (Suppl. 6): 40-41.
19. **Herszényi L**, Sipos F, Galamb O, Hritz I, Györffy B, Molnár B, Tulassay Z. The behaviour of matrix metalloproteinase-9, hepatocyte growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor-1 expressions in ulcerative colitis.
Z Gastroenterol 2006; 43: 411-458; A 42.
20. Hritz I, **Herszényi L**, Wex T, Malfertheiner P, Tulassay Z. Secretory leucocyte protease inhibitor in various types of gastritis- a specific role of H. pylori infection.
Z Gastroenterol 2006; 43: 411-458; A 48.
21. Németh A, Lakatos G, **Herszényi L**, Czintner D, Juhász M, Hritz I, Pregun I, Tulassay Z. The incidence of hiatal hernia, reflux esophagitis and Barrett's esophagus between 2003 and 2005.
Z Gastroenterol 2006; 43: 411-458; A 82.
22. Galamb O, Györffy B, Sipos F, Spisák S, **Herszényi L**, Miheller P, Tulassay Z, Molnár B. Inflammation, adenoma and cancer: objective classification of colon biopsy specimen by whole genomic mRNA expression analysis.
Gut 2006; 55 (Suppl V): A 69.
23. Molnar B, Galamb O, Galamb B, Solymosi N, Sipos F, Spisak S, Toth K, Miheller P, Zagoni T, **Herszényi L**, Tulassay Z. Peripheral blood gene expression markers of local and progressive colorectal disease determined by whole genome mRNA array analysis.
Gastroenterology 2007; 132 (4) (Suppl. 2): A 295.
24. **Herszényi L**, Farinati F, Plebani M, Tulassay Z. The tumor marker behavior of proteolytic enymes in colorectal cancer.
Gastroenterology 2008; 134 (Suppl. 1): A 445.
25. Hritz I, Györffy H, Molnár B, Lakatos G, Sipos F, Tulassay Z, **Herszényi L**. Increased P53 and matrix metalloproteinase-9 expression in the malignant transformation of Barrett's esophagus is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment and decreased glutathione S-transferase expression. 16th United European Gastroenterology Week „UEGW 2008”, Vienna, Austria, 18-22 October 2008. /*elfogadva*/.
Gut 2008; (elfogadva, *in press*).

7.4. Értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek

1. **Herszényi L**, Tulassay Z. A vastagbélrák modern klinikai megítélése. In: „*A vastagbélrák megelőzése és kezelése*” (Szerk. Tulassay Z). Springer, Budapest, 2004. pp: 93-106.
2. **Herszényi L**, Tulassay Z. A vastagbélrák kemoprofilaxisa. In: „*A vastagbélrák megelőzése és kezelése*” (Szerk.: Tulassay Z). Springer, Budapest, 2004. pp: 143-156.
3. **Herszényi L**. A nyelöcső és a gyomor betegségei az öregedés során. In: „*Geriátria – az időskor gyógyítása*” – Egyetemi Tankönyv (Szerk.: Székács B). Semmelweis Kiadó. 2005. pp: 256-265.
4. **Herszényi L**. Vastagbél-kórfolyamatok előrehaladott életkorban. In: „*Geriátria – az időskor gyógyítása*” –Egyetemi Tankönyv (Szerk.: Székács B). Semmelweis Kiadó. 2005. pp: 266-273.
5. Tulassay Z, **Herszényi L**. A fekélyes vastagbélgyulladás állandó orvosi ellenőrzést igényel (Pancolitis ulcerosa). In: „*Klinikopathológiai esettanulmányok*” (Szerk.: Szende B, Schaff Zs, Zalatnai A) Medicina, Budapest, 2003. pp. 148-151.
6. Tulassay Z, **Herszényi L**. Nem minden tumor ami vérzik (Polypus coli). In: „*Klinikopathológiai esettanulmányok*” (Szerk.: Szende B, Schaff Zs, Zalatnai A) Medicina, Budapest, 2003. pp. 152-155.
7. Tulassay Z, **Herszényi L**. Nem szteroid gyulladásgátló mellékhatása (NSAID által okozott gastroduodenopathia). In: „*Klinikopathológiai esettanulmányok*” (Szerk.: Szende B, Schaff Zs, Zalatnai A) Medicina, Budapest, 2003. pp. 368-372.
8. **Herszényi L**. A nyelöcső daganatai; A gyomor daganatai; Vékonybél-daganatok; Vastag- és végbél-daganatok (Alfejezetek). In: „*A Belgyógyászat alapjai*” – Egyetemi Tankönyv (Szerk.: Tulassay Z). Medicina, Budapest, 2007. pp. 1014-1043.
9. **Herszényi L**, Tulassay Z. (Gastroenterológiai betegségek - „Biokémia a gasztroenterológiában” fejezet: Gyomorszekréció; Gyulladásos bélbetegségek) In: „*Orvosi patobiokémia*” – Egyetemi Tankönyv (Szerk.: Mandl J). Medicina, Budapest, 2007. pp. 533-557.
10. **Herszényi L**, Tulassay Z. (Gastroenterológiai fejezet: Gastro-oesophagealis refluxbetegség; Fekélybetegség; Gyulladásos bélbetegségek) In: „*Farmakológiai és Farmakoterápia*” – Egyetemi Tankönyv (Szerk.: Kerpel-Fronius S). Medicina, Budapest, 2008. pp. 222-236.
11. **Herszényi L**. (fejezetszerkesztő; 14. fejezet: Az emésztőrendszeri daganatok modern onkológiai kezelésének alapelvei). In: „*Varró Gastroenterológia és hepatológia*”(Szerk.: Lonovics J, Nemesánszky E, Simon L, Tulassay Z, Wittmann T). Medicina, Budapest (2009, szerkesztés alatt).

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik értekezésem megírását lehetővé tették és segítették.

Mindenekelőtt *Professzoraimnak* mondok köszönetet.

Megkülönböztetett hálával és köszönettel tartozom *Tulassay Zsolt* Professzornak, aki szakmai és tudományos munkám minden mozzanatát messzemenően segítette-támogatta. Irányítása alatt a beteg ember szeretete mellett megtanulhattam a klinikai kutatómunkával és oktatással szembeni alázatot. Iskolájában megerősödött bennem a kitartó, tisztességes munka becsületébe vetett hitem.

Köszönöm *Fehér János* Professzornak, hogy kezdő orvosként támogatta klinikai beilleszkedésemet és munkámat.

Köszönetemet fejezem ki a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika *mindazon munkatársának*, akik értekezésem elkészítésében segítségemre voltak. A Gasztroenterológiai Endoszkópos Laboratórium és a Sejtanalitikai Laboratórium munkatársainak segítségével nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Külön köszönettel tartozom *Dr. Sipos Ferenc* kollégámnak.

Köszönöm azon Ph.D. hallgató kollégák együttműködését, akiknek témavezetője lehettem. Külön kiemelem *Dr. Hritz István Ph.D.* kollégám önzetlen segítségét.

Munkám nem készülhetett volna el egy széleskörű hazai- és nemzetközi együttműködés nélkül. Köszönettel tartozom a megjelent dolgozatokban szereplő összes szerzőtársnak. Külön köszönöm a padovai egyetemen *Fabio Farinati* Professzor önzetlen támogatását.

Köszönöm *Családomnak* a biztos hátteret, a rengeteg áldozatot és segítséget.