

A hisztamin metabolizmus és a hisztamin receptorok változása humán colorectalis tumorokban

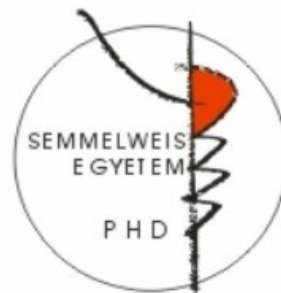
Doktori tézisek

Dr. Boér Katalin

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

A human molekuláris genetika és géndiagnosztika alapjai program



Témavezető: Dr. Darvas Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Szántó János egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Dank Magdolna egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gergely Péter egyetemi tanár, Dsc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szántó János egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Buzás Edit egyetemi docens, Dsc.

Budapest

2008

BEVEZETÉS

A hisztamin fontos mediátor a szervezetben, elsődleges szerepe az akut gyulladásos és allergiás reakciókban van. A hisztaminnak a gastrointestinalis rendszerben három jól ismert farmakológiai funkciója van, emellett a neurotranszmisszióban, az immunválasz modulációjában és a sejtproliferációban betöltött szerepei is ismeretesek. A hisztamin évtizedek óta áll a kutatók érdeklődésének központjában, különös tekintettel metabolizmusának enzimeire (HDC, DAO és HNMT), a hisztamin receptorokra és a receptorok által aktivált intracelluláris jelátviteli útvonalakra.

A hisztamin és a rosszindulatú daganatok közötti kapcsolat kérdése akkor került előtérbe, amikor kiderült, hogy a gyorsan proliferáló normális szövetekben és egyes benignus elváltozásokban egyaránt emelkedett hisztamin koncentráció mutatható ki. Számos adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a hisztamin direkt és indirekt hatásokon keresztül fokozza a tumorsejtek proliferációját, és végső soron a tumor növekedését segíti elő. A hisztamin, mint növekedési faktor, a tumorsejtre direkt hatást fejt ki, ugyanakkor, mint gyulladásos mediátor és immunmoduláns, szintén a daganatsejtek növekedésének irányába hat. A hisztamin emellett elősegíti a neoangiogenesis is, és gátolja a hatékony tumorellenes immunválaszt, ezáltal szintén elősegítve a tumor növekedését. A helyileg képződő hisztamint részben maguk a tumorsejtek, részben a peritumorális térben megjelenő immunkompetens sejtek termelik. Irodalmi adatok alapján a malignus tumorokban észlelt magas hisztamin-szint a lokális termelődés, az emelkedett HDC és a csökkent DAO vagy HNMT aktivitás együttes eredője lehet. A hisztamin szintézisében kulcsszerepet játszó HDC overexpresszióját számos rosszindulatú daganatban leírták, mint pl. colorectalis-, emlő-, gyomor- és tüdőcarcinomában, valamint bizonyos hematológiai betegségekben.

A hisztamin hatásait a hisztamin receptorok (H1R- H4R) expressziós profilja és az intracellulárisan aktivált jelátviteli utak molekuláris mechanizmusa határozza meg. Attól függően, hogy a hisztamin melyik receptorán keresztül kapcsolódik a daganatos sejthez, gátolhatja, vagy éppen elősegítheti az adott sejt proliferációját. A hisztamin hatása tumorsejt típusonként is változó, ugyanis a receptorok lokális aránya és

hozzáférhetősége határozza meg az eredményt, a daganatsejt osztódásának serkentését vagy gátlását.

A colorectalis tumorok és a hisztamin közötti összefüggés tanulmányozására irányuló kutatások eredményei hívták fel a figyelmet a hisztamin lehetséges szerepére a vastagbélrák kialakulásában és progressziójában. A hisztamin fokozza a vastagbél daganatok növekedését, erre vonatkozóan in vivo és in vitro kísérletek adatai szolgálnak bizonyítékkal. Továbbá, ismert, hogy a colon tumorok a hisztamint termelő daganatok csoportjába tartoznak. Humán vastagbél adenocarcinómában már korábbi vizsgálatokban is magasabb hisztamin tartalmat mutattak ki a normál szövethez képest, és ezt a hisztamin mennyiséget elegendőnek tartották ahhoz, hogy lokálisan immunszuppresszív hatást is előidézzon. Több közleményben is leírták, hogy colorectalis daganatokban magas a HDC aktivitás, majdnem kétszer olyan magas, mint a normál szövetben. Kimutatták, hogy a colon tumor sejtvonalakon a hisztamin hatásait a tumorsejt növekedésére a H₂R-on keresztül fejtette ki. Korai és metasztatikus stádiumú colorectalis daganatos betegek bevonásával klinikai vizsgálatok is történtek pre- és/vagy posztoperatív időszakban alkalmazott H₂R-antagonistákkal (cimetidin, ranitidin és famotidin), a legtöbb vizsgálatban a túlélés javulását írták le, bár az eredmények még ellentmondásosak. A colorectalis tumorok és adenomák közötti kapcsolat is régóta ismert, elfogadott tény, hogy a prekancerózus elváltozásnak tekintett vastagbél adenomák bizonyos típusaiból adenocarcinoma alakulhat ki.

Irodalmi adatok alapján colorectalis tumorokban a hisztamin metabolizmusában résztvevő enzimek (HDC és DAO) aktivitását és fehérjeszintű expresszióját vizsgálták. A hisztamin receptorok jelenlétét és expressziós megoszlását malignus sejtvonalakon, állatkísérletekben, illetve humán tumorokban agonisták illetve antagonisták alkalmazásával egyaránt tanulmányozták. A gastrointestinalis traktusban a hisztamin receptorok jelenlétét 2006-ben mutatták ki először. Vizsgálták a receptorok jelenlétét és megoszlását normál vastagbél mucosában, illetve leírták azok változását gyulladós bélbetegségben (IBD). A hisztamin metabolizmusára és a hisztamin receptorok megoszlására vonatkozóan nem végeztek összehasonlító vizsgálatokat vastagbél adenomában és adenocarcinómában.

A hisztamin hatásának mechanizmusai tumorokban ma még nem teljesen tisztázottak, ugyanakkor ezek részletes tanulmányozása rendkívül fontos lehet a betegek kezelésekor számba veendő új prognosztikai faktorok és terápiák szempontjából.

Doktori munkám során a hisztamin metabolizmust és a hisztamin receptorokat vizsgáltam vastagbél adenocarcinomában és adenomában, összehasonlítva a normál nyálkahártyával. Tudomásunk szerint hazai és nemzetközi viszonylatban is elsőként vizsgáltuk a hisztamin metabolizmust adenomában, továbbá elsőként írtuk le a hisztamin receptorok valósídejű RT-PCR és fehérjeszintű expresszióját colorectalis tumorban.

CÉLKITŰZÉSEK

A hisztamin és a colorectalis carcinoma kapcsolatának vizsgálata a hisztamin metabolizmus és receptorok megoszlásának analízisén keresztül vastagbél adenomában, adenocarcinomában és a normál nyálkahártyában.

A hisztamin koncentráció és a hisztamin metabolizmus enzimeinek (HDC és DAO) összehasonlító vizsgálata vastagbél adenomában, adenocarcinomában és a normál nyálkahártyában.

A hisztamin receptorok (H1R-H4R) expressziójának és megoszlásának vizsgálata vastagbél adenomában, adenocarcinomában és normál mucosában.

A hisztamin receptorok (H1R- H4R) expressziójának összehasonlító vizsgálata Dukes stádiumok szerint klasszifikált colorectalis tumorokból származó daganatmintákban és normál nyálkahártyában.

CD8+ T-limfociták immunhisztokémiai vizsgálata vastagbél adenomában és adenocarcinomában.

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

A HDC enzim immunhisztokémiai vizsgálata 40 colorectalis carcinoma- és 20 adenoma mintán történt.

A HDC Western blot vizsgálatot 20 colorectalis carcinoma- és 10 adenoma-, valamint a hozzá tartozó, kontrollként szolgáló normál mucosa mintákon végeztünk.

A DAO aktivitás mérése 20 colorectalis carcinoma-, 10 adenoma- és normál mucosa mintán történt.

A hisztamin koncentráció mérését HPLC módszerrel 20 colorectalis carcinoma-, 20 adenoma- és ugyanennyi normál mucosa mintában végeztük.

A H1- és H2 receptor RT-PCR analízis 20 adenocarcinoma mintán történt.

A hisztamin receptorok analízise Western blot módszerrel 20 adenocarcinoma-, 18 adenoma- és a hozzá tartozó normál mucosa mintán történt.

A hisztamin receptorok analízisét (H1R-H4R) 40 Dukes stádiumok szerint besorolt colorectalis tumor- és a hozzá tartozó normál mucosa mintákból is elvégeztünk valósídejű RT-PCR és Western blot módszerek alkalmazásával.

A hisztamin receptorok (H1R, H2R és H4R) indirekt immunhisztokémiai kimutatása 12 carcinoma- és a hozzá tartozó normál mucosa mintában történt.

A CD8+ T limfociták kimutatását indirekt immunhisztokémiai módszerrel végeztük 12 carcinoma- és 12 adenoma mintában.

Statisztikai analízisek

Az egyes mérési eredmények kiértékeléséhez a következő statisztikai eljárásokat alkalmaztuk:

HDC fehérje expresszió (adenocarcinoma, adenoma és normál mintában vizsgáltuk) Western blot analízis kiértékelése: kétmintás kétoldalú t-próbával.

DAO enzimaktivitás mérése (adenocarcinoma, adenoma és normál mintában vizsgáltuk): egyutas ANOVA-t követő Tukey post hoc- teszttel.

Hisztamin koncentráció meghatározása: Kruskal- Wallis teszttel.

Hisztamin receptor expresszió mérés valósídejű PCR módszerrel, denzitometriás analízissel: kétutas ismétléses varianciaanalízissel (ANOVA)

EREDMÉNYEK

Kísérleteink kezdetén colorectalis tumormintákban és adenomaszövetben HPLC módszerrel quantitív hisztamin koncentráció meghatározásokat végeztünk. Az irodalomból már ismert volt, hogy vastagbél tumorokban emelkedett hisztamin tartalom mérhető, ezzel szemben az adenomák hisztamin tartalmát korábban még nem vizsgálták. Hisztamin koncentrációra vonatkozó mérési eredményeink szerint az adenomaszövet hisztamin tartalma nem különbözik a normál szövetétől. Ezzel szemben az adenocarcinoma mintákban szignifikánsan magasabb hisztamin-szinteket mértünk a normál szövethez viszonyítva, az irodalomban leírtakkal összhangban. Összehasonlításként megmértük a hisztamin tartalmat humán bazofil és melanoma sejtvonalakban is, ugyanis ezekben már korábbi kísérleteink során igazoltuk HDC aktivitás és hisztamin jelenlétét. Eredményeink szerint a humán colorectalis tumorra magas hisztamin tartalom jellemző.

Ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk a hisztamin metabolizmusáról adenocarcinomában és adenomában, kutatásainkat a hisztamin metabolizmusában szerepet játszó enzimek (HDC és DAO) vizsgálatával folytattuk. Carcinoma- és adenoma mintákból immunhisztokémiai módszerrel és Western blot analízissel HDC kimutatást végeztünk. Vastagbél adenocarcinomában már korábban is igazolták a HDC fehérje jelenlétét Western blot módszerrel, azonban a HDC fehérje sejten belüli (in situ) kimutatása HDC ellenanyag hiányában nem történhetett meg. Az első HDC ellen termelt ellenanyag a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet és a Promega cég közös szabadalma volt. Indirekt immunhisztokémiai módszerrel mind carcinomában, mind adenomában nagyfokú in situ HDC pozitívítást tudtunk kimutatni. A carcinoma minták 90 %-ában észleltünk festődést. A tumorminták nagy részében a daganatsejtekhez hasonlóan HDC pozitív sejteket mutattunk ki a stromában is, melyben valószínűleg tumor infiltráló sejtek, mint pl. limfociták és hízósejtek populációja volt jelen. Fontosnak érezzük azt a megfigyelésünket, hogy maguk a daganatsejtek is jelentős HDC festődést mutattak, és ezáltal igazoltnak láttuk, hogy a tumorsejtek is termelhetnek hisztamint. Az adenoma szövetek 100%-ában észleltünk erős HDC enzim pozitívítást. A HDC jelenlétét nemcsak az adenoma epitheliális sejteiben és a tumorsejtekben észleltük, hanem jelentős HDC pozitívítást figyelhettünk meg a stromában, a malignus

és a benignus elváltozásokban egyaránt. Adenocarcinoma esetében a HDC festődés kifejezettebb volt a daganatsejtekben mint a stromában, adenomákban viszont a stromában figyelhettünk meg intenzívebb pozitívítást.

A HDC immunhisztokémiai meghatározások során a lamina propriában észlelt, festődést mutató sejtek populációit tumorszövetet infiltráló sejtek, mint pl.

T-limfociták, hízósejtek, stb. képezhették. A CD8+ citotoxikus T-sejtek szerepe vitathatatlan a tumorellenes immunválaszban. A CD4+, segítő (helper) T-limfociták elengedhetetlenül szükségesek a specifikus immunfolyamatok kialakulásához, citokin termelésük révén fontos kapcsolatot teremtenek a természetes és az adoptív immunrendszer között. Irodalmi adatokat is figyelembe véve, a stromában az általunk kimutatott HDC pozitív sejtek között CD4+ és CD8+ T-sejtek lehettek jelen. Előbbiekre való tekintettel mind az adenocarcinoma-, mind az adenoma mintákban elvégeztük a CD4+ és CD8+ T-limfociták immunhisztokémiai kimutatását. Fontosnak érezzük azon megfigyelésünket, hogy az adenomákban jelentős számban találtunk CD8+ T-limfocitákat, ezzel szemben az adenocarcinomákban csak elvétve találtunk egy- egy ilyen típusú sejtet. A CD4+ T- limfociták számát tekintve nem volt különbség az adenoma és carcinoma szövet között.

További kísérleteink során a vizsgált malignus és benignus elváltozások biopsziás mintáiból igazoltuk a HDC fehérjeszintű expresszióját is. A HDC fehérje monomer formája többnyire 50-53 kDa molekulásúlyú, de sejtípustól függően a 63 kDa, esetleg 74 kDa molekulásúlyú forma is kimutatható. HDC Western blot vizsgálataink során a 53 kDa molekulásúlyú HDC fehérje monomer formájával találkoztunk, az irodalmi adatokkal összhangban. Pozitív kontrollként az M1/15 melanoma sejtvonalat használtuk, amelyben már előzőleg igazoltuk a HDC fehérje jelenlétét Western blot analízissel. Eredményeinket denzitometriás analízisekkel is kiértékeltek, ezzel a módszerrel is egyértelműen emelkedett HDC expressziót észleltünk mind a carcinoma, mind az adenomaszövetben. Az adenoma és adenocarcinoma minták HDC expressziójában magasabb szinteket észleltünk, mint a normál nyálkahártya esetében; a különbség ugyan nem szignifikáns, de tendencia értékű. A malignus tumorban észlelt eredményeink összhangban vannak az irodalmi adatokkal. Vastagbél adenomában munkacsoportunk mutatta ki elsőként a HDC fehérjeszintű expresszióját.

A gastrointestinalis traktusban a hisztamin inaktiválása elsősorban a DAO enzim hatására történik direkt oxidációval, így a hisztamin metabolizmus vizsgálatát a DAO aktivitás mérésével folytattuk. Adenocarcinómában szignifikánsan alacsonyabb DAO enzim aktivitást mértünk az adenomához és a normális mucosához képest ($p < 0,01$). Ezek az eredmények egybehangzanak az irodalmi adatokkal, melyek alapján a tumorban mérhető magas hisztamin tartalom részben a csökkent DAO aktivitás következménye lehet. Vastagbél adenomák DAO aktivitását korábban más munkacsoportok nem vizsgálták. A hisztamin és HDC kimutatására vonatkozó eredményeink szerint adenomában az emelkedett HDC expresszió ellenére sem volt magas a hisztamin tartalom, ez részben magyarázatot ad arra, hogy az adenomákban miért volt mérhető magas DAO aktivitás.

A hisztamin hatásait specifikus receptorain (H1R-H4R) keresztül fejti ki, a hisztamin hatások a receptorokon keresztül aktivált jelátviteli rendszeren keresztül manifesztálódnak. A hisztamin receptorok közül széles körben hármat elemeztek, a H1R-t, H2R-t és H3R-t. A hisztamin ezek aktivációján keresztül fejti ki a legtöbb ismert hatását. Experimentális és humán tumorokban egyaránt vizsgálták és leírták a H1R és H2R szerepét, ezzel szemben a H3R és H4R funkciója tumorokban még nem tisztázott. Colorectalis carcinómában a hisztamin receptorok megoszlására vonatkozóan kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, sőt a H4R-szerepét nem is vizsgálták. Ezzel szemben egyes kutatócsoportok kimutatták vastagbél sejtvonalakon, hogy a hisztaminnak a tumorsejt növekedésére kifejtett hatásai a H2R-on keresztül érvényesülnek.

Kutatásaink kezdetén RT-PCR vizsgálattal igazoltuk a H1R és H2R-ok jelenlétét vastagbél carcinoma mintákban, majd kísérleteinket a receptorok Western blot analízisével folytattuk. A vizsgált adenoma, adenocarcinoma és normál colorectalis mucosa biopsziás mintákban a négy ismert hisztamin receptor közül hármat tudtunk kimutatni (H1R, H2R és H4R). A receptorok fehérjeszintű expressziójának analízise során H3R-t kevés mintában sikerült identifikálni. Ezzel egyidőben, 2006-ban Sander és munkatársai leírták a hisztamin receptorok megoszlását a normál gastrointestinalis szövetben. Eredményeik szerint a normál mucosa enterocytái H1R, H2R és H4R-kat expresszálnak, míg H3R jelenlétét nem tudták igazolni. Ezen kívül elemezték a receptorok expressziós profilját gyulladássos- és allergiás bélbetegségben, viszont nem végeztek összehasonlító vizsgálatokat a normál mucosával. A leírt receptor

megoszlásokban saját eredményeink megerősítését láttuk arra vonatkozóan, hogy a normál gastrointestinalis mucosában nem expresszálódnak H3R-ok.

Eredeti hipotézisünk szerint az adenoma mintákban már olyan, a normáltól különböző hisztamin metabolizmusra számítottunk, mely átmenetet képezhetett volna az adenocarcinómában észlelt eltérésekhez. Tekintve, hogy adenómában sem a hisztamin-szint sem az enzim aktivitás (HDC és DAO) értékei nem változtak meg a normál vastagbél mucosához képest, figyelmünket további kísérleteink során a malignus tumorokra összpontosítottuk. A hisztamin receptorok analízisét műtétek során nyert, 40, Dukes stádiumok szerint klasszifikált tumorból származó minták elemzésével folytattuk. A receptorok messenger RNS-szintű expressziójának vizsgálata is igazolta, hogy a vizsgált 4 hisztamin receptor (H1R-H4R) közül 3, a H1R, H2R és H4R valamennyi normál és adenocarcinoma mintában kimutatható volt. Továbbá, az analízisek során jelentősen megváltozott receptor expressziót észleltünk a vizsgált tumorokban. A H1R és H4R szintje a normál mintákéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt a malignus szövetekben ($p < 0,001$). A H2R-ok esetében nem találtunk szignifikáns változást a normál mucosa receptor expressziójával összehasonlítva. A H3R a mRNS analízisek során is csak néhány mintában (3/38, azaz 7,9%) volt kimutatható.

A receptor vizsgálatokat fehérjeszintű kimutatásokkal folytattuk. A Dukes stádiumok szerint klasszifikált tumorokból származó minták Western blot analízisei a valós idejű RT-PCR vizsgálati eredményeivel egybehangzóak voltak. A négyféle hisztamin receptor közül fehérjeszinten is három, a H1R, H2R és H4R jelenléte volt kimutatható. Szintén csökkent H1R és H4R expressziót találtunk a Western blot eredmények denzitometriás kiértékelésénél tumorokban. A H4R kifejeződése a tumorokban a normál szövethez képest szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$), ezzel szemben a H1R csökkenése nem volt szignifikáns, csak tendencia értékű ($p = 0,06$). Érdekes módon a H2R expresszióban nem volt változás a normál mucosához képest ($p = 0,36$). A fehérjeszintű kimutatás is alátámasztotta a receptorok mRNS-szintű expresszióját, a normális nyálhártyával összehasonlítva szignifikánsan csökkent H4R szintet találtunk. Ezek az eredmények határozottan ellentétesek a gyulladásoos bélbetegségben leírtakkal, ahol más szerzők H1R és H2R upregulációt észleltek. A receptorok valós idejű RT-PCR és Western blot analízisei során egy másik fontos

megfigyelésünk is volt: nem találtunk összefüggést a receptorok expressziójának mértéke és a Dukes stádiumok között.

Az adenocarcinoma mintákban immunhisztokémiai módszerrel is elvégeztük a hisztamin receptorok analízisét, a normál mucosával összehasonlítva. Eredményeink alátámasztották a génexpressziós vizsgálatok eredményeit: mindhárom receptor (H1R, H2R, és H4R) jelenléte kimutatható volt. A normál vastagbél mucosa és submucosa mintákban intenzívebb H1R, H2R és H3R festődést láthattunk az epitheliális sejtekben, míg a stromában csak kisebb mértékű pozitivitás volt megfigyelhető. A tumorszövetben ugyanazok a receptorok (H1R, H2R és H4R) voltak kimutathatóak. A daganasejtek esetében intenzívebb festődést észleltünk, mint a stroma sejtjeiben. Immunhisztokémiai eredményeink is egyértelműen azt igazolták, hogy a normál epitheliális sejtekben jelenlévő hisztamin receptorok (H1R, H2R és H4R) a tumorsejtekben is megtalálhatóak voltak. Ismételten megállapítottuk, hogy a tumorszövetben a hisztamin receptorok expressziója mennyiségben és megoszlásban eltért a normál mucosa sejtjeiben észleltektől, elsősorban a H1R és H4R vonatkozásában.

További kísérletek szükségesek ahhoz, hogy a hisztamin receptorok által közvetített hatásmechanizmusokat a vastagbél tumorok vonatkozásában jobban megértsük. Eredményeink arra utalnak, hogy a megváltozott receptor expresszió jelentős hatással lehet nemcsak a daganatsejtek proliferációjára, hanem a tumor mikro környezetében zajló immunfolyamatokra is. Változatlan H2R expresszió és csökkent H1R és H4R szintek mellett ugyanolyan hatások jöhetnek létre, mint izoláltan magas H2R expresszió esetében. A receptorok jelenléte és aránya a melanoma malignumnál észleltekhöz hasonló befolyással lehet a colon tumorsejtekre. Ugyanis melanomában kimutatták, hogy a hisztamin a daganatsejt proliferációját fokozó hatását a H2R-on keresztül fejt ki. Tumorok vonatkozásában már jól ismertek a hisztamin immunválaszban kifejtett hatásai, további hatásai pedig az angiogenesis és metastasis-képződés elősegítésében érhetőek tetten. A hisztamin befolyást gyakorol a citokinek képződésére (pl. IL-1, TNF- α , IL-10 és IL-12), továbbá a monocyták, a dendritikus sejtek és T-limfociták érési folyamataira. Kimutatták, hogy az aktin polymerizációját és a kemotaxist is elősegíti.

Egyes kísérleti rendszerekben megfigyelték, hogy a hisztamin az immunregulációs mechanizmusra kifejtett hatásai során elősegíti a Th2-limfociták által

közvetített humorális immunválaszt. A hisztamin részben a Th2-limfociták citokin termelésének stimulálásával, részben az aktivált monocyták és makrofágok IL-12 termelésének gátlásával gyengíti a tumorelleses citotoxikus immunválasz hatékonyságát. Saját eredményeink is azt sugallják, hogy vastagbél carcinomában a H1R és a H4R downreguláció a tumorsejtek számára teremt kedvező feltételeket, hiszen a relatíve erős H2R expresszió mellett negatív irányban befolyásolja a Th1- limfociták válaszkésztségét. A tumorok progressziójában a vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF) fokozott termelődése, és az ezzel együtt járó fokozott neoangiogenesis is fontos tényező. Evidenciának tekinthetjük, hogy a hízósejtek és tumorsejtek által kibocsájtott hisztamin a H2R-kon keresztül a neoangiogenesisist is fokozza. Colon tumorban a változatlan H2R expresszió mellett jelen levő H1R downreguláció elősegítheti a tumor neoangiogenesisét, akárcsak a metasztázisok képződését.

További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy colon carcinomában milyen sejttípusokra és/vagy a tumor infiltráló sejtekre érvényes az általunk észlelt csökkent H1R és H4R expresszió. Ezáltal tisztázni lehetne, hogy melyek a hisztamin legfontosabb hatásai a vastagbélrák kialakulásában és progressziójában, illetve felállíthatnánk direkt és/vagy indirekt hatásainak fontossági sorrendjét a vastagbél tumorok vonatkozásában. Vastagbélrákos betegek esetében H2-antagonistákkal (cimetidin, ranitidin és famotidin) végzett vizsgálatok során leírták ugyan a cimetidin túlélésre gyakorolt pozitív hatását, de ennek a pontos hatásmechanizmusa még tisztázásra szorul; az eredmények ugyanis egyelőre ellentmondásosak.

Összefoglalva, elmondhatjuk, hogy az irodalmi adatokkal összhangban a vastagbél carcinomában magas hisztamin tartalmat mértünk, melyet részben a fokozott hisztamin képződés (a kimutatott magas HDC aktivitáson keresztül), és részben a csökkent lebontás (alacsony DAO aktivitás) magyaráz. Annak reményében végeztük az adenomák vizsgálatait, hogy ezekben a prekancerózus elváltozásokban olyan megváltozott hisztaminszinteket, illetve HDC és DAO enzim aktivitást észlelünk, melyek már átmenetet képezhetnek az adenocarcinomában észlelt megváltozott hisztamin metabolizmushoz. Ezzel szemben mégsem tudtuk igazolni, hogy már adenomákban is megváltozna a hisztamin metabolizmusa a normál mucosához képest. A hisztamin receptorok szintjén meglehetősen sajátos helyzettel találkoztunk (H1R és H4R downreguláció változatlan H2R expresszió mellett), ez jelentősen eltér a normál

nyálkahártyában, illetve a gyulladássos bélbetegségben más szerzők által leírt HR expressziós profiltól.

A hisztamin tumorokban manifesztálódó hatásmechanizmusai még nem teljesen tisztázottak, a hatások eredőjét alapvetően a hisztamin receptorok megoszlása és a receptor-típusok aránya határozza meg. A hisztamin hatásmechanizmusainak részletes tanulmányozása rendkívül fontos lehet a vastagbélrákos betegek kezelésekor számba veendő új prognosztikai faktorok és terápiák szempontjából.

KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

A colorectalis tumorokban a HDC enzim aktivitás jelenléte irodalmi adatokból már ismert volt, de a HDC fehérje sejten belüli (in situ) kimutatása HDC ellenes ellenanyag hiányában nem történt meg. A HDC ellenes ellenanyag elsőkénti előállítása a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet és a Promega cég közös szabadalma. **A HDC enzimet munkacsoportunk mutatta ki először immunhisztokémiai módszerrel colorectalis adenomában és adenocarcinomában. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy jelentősen megváltozik a HDC enzim jelenléte és aktivitása a tumorokban és az adenomákban a normális szövethez képest. A tumorsejtekben kimutatott HDC pozitívítással azt igazoltuk, hogy maguk a tumorsejtek is termelhetnek hisztamint.**

Kimutattuk másokhoz hasonlóan, hogy colorectalis tumorokban megváltozik a hisztamin metabolizmus. **Következtetésünk, hogy a HDC aktivitás fokozódása mellett a DAO enzim aktivitása csökken, és ez vezet a tumorokra jellemző emelkedett hisztamin-szinthez.**

Elsőként mutattuk ki, hogy colorectalis adenomákban nincs változás a hisztaminszint és a hisztamin metabolizmusában szerepet játszó enzimek (HDC és DAO) aktivitásának tekintetében a normál mucosához képest. Adenomákban sem a hisztaminszint, sem a DAO aktivitás változása nem volt kimutatható. **Következtetéseink: adenomában a normális hisztaminszint a normál mucosáéval azonos DAO aktivitás tükröződése lehet; a tumorban észlelt megváltozott hisztamin metabolizmus a még nem malignizálódott adenomákra nem jellemző.**

Az irodalomban kevés adat áll rendelkezésre a colorectalis tumorok hisztamin receptorainak megoszlására vonatkozóan, ugyanakkor az adenomák receptor

expresszióját más munkacsoportok korábban nem vizsgálták. **Elsőként írtuk le adenomákban a hisztamin receptorok fehérjeszintű expresszióját. Eredményeink szerint adenocarcinomában, adenomában és a normál nyálkahártyában a hisztamin négy ismert receptorából három (H1R, H2R, H4R) receptor jelenléte mutatható ki.**

A hisztamin receptorok fehérjeszintű expresszióját már vizsgálták adenocarcinomában. **Elsőként mutattuk ki, hogy colorectalis carcinomában megváltozik az expresszált hisztamin receptorok megoszlása (csökkent H1R és H4R szintek mellett változatlan H2R) a normál mucosához képest, és ez a változás minden tumorra jellemző, függetlenül a daganat Dukes stádium szerinti besorolásától.**

Új eredménynek tekinthető a hisztamin receptorok immunhisztokémiai módszerrel történő kimutatása is. **Eredményeink alapján a normál vastagbél mucosában és az adenocarcinomában is ugyanaz a 3 receptor (H1R, H2R és H4R) mutatható ki immunhisztokémiai módszerrel.**

Vizsgálati eredményeink alapján megállapítható, hogy a H1R és H4R receptorok down-regulációja kedvezhet a tumor növekedésének. Tekintve, hogy a hisztamin a H2-receptoron keresztül fejt ki immunszuppresszív hatását, a H2R a daganat-ellenes terápia ígéretes célpontját képezheti.

ÖSSZEFOGLALÁS

A hisztamin és a colorectalis daganatok kapcsolatának vizsgálata széleskörű kutatás tárgyát képezi. Vastagbélrákban korábban már kimutatták a lokálisan képződő hisztamin és a hisztamin szintézisében szerepet játszó HDC enzim jelenlétét. A hisztamin hatását colorectalis tumorban részben a hisztamin receptorok expressziós profilja, részben a receptorokon keresztül közvetített intracelluláris szignálok határozzák meg. Klinikai vizsgálatok tanúsága szerint a pre- és/vagy posztoperatív időszakban alkalmazott H₂-receptor antagonisták adásával meghosszabbítható a vastagbélrákos betegek túlélése, igaz, az adatok ellentmondásosak. Ismert, hogy a vastagbél adenomák egyes típusai magukban rejtik a carcinoma kialakulásának potenciális veszélyét. Kutatásunk tárgyát a hisztamin metabolizmusának és a hisztamin receptorok jelenlétének, illetve megoszlásának analízise képezte humán colorectalis tumorokban. A vizsgálatok vezérfonala a vastagbél adenoma és a normál nyálkahártya hisztamin metabolizmusának összehasonlító analízise volt. Eredményeink szerint vastagbél carcinomában a magas hisztamin-szintért a fokozott HDC és a csökkent DAO enzim aktivitás felelős. Eredeti hipotézisünk alapján adenomában a hisztamin metabolizmus olyan eltéréseire számítottunk, melyek átmenetet képezhetnek a rosszindulatú tumorra jellemző hisztamin metabolizmus irányába. Eredményeink nem igazolták várakozásunkat, a hisztamin metabolizmusa az adenomában és a normál mucosában nem tért el egymástól. A receptorok tekintetében, adataink szerint jelentős eltérés van a normális mucosa és a rosszindulatú daganat hisztamin receptor profilja között. A receptorok kifejeződése meglehetősen sajátosnak bizonyult a Dukes stádiumok szerint válogatott daganatmintákban: változatlan H₂R mellett csökkent a H₁R és H₄R expressziója. Ez ugyanis jelentősen eltér a normál nyálkahártyában, illetve a gyulladással járó bélbetegségben, más szerzők által leírt hisztamin receptor profiltól. Ez a megváltozott receptor expresszió teljesen azonos eloszlást mutatott a különböző Dukes stádiumokba tartozó daganatminták esetében. A hisztamin tumorokban manifesztálódó hatásmechanizmusai még nem teljesen tisztázottak, ezek további tanulmányozása fontos lehet a vastagbélrákos betegek kezelésekor számba veendő új prognosztikai faktorok és terápiák szempontjából.

A DISSZERTÁCIÓVAL KAPCSOLATOS KÖZLEMÉNYEK

1.1. A doktori értekezésben összefoglaltakkal kapcsolatos saját és társszerzős közlemények

1. **Boér K**, Darvas Z, Baki M, Kaszás I, Pál Z, Falus A. (2003) Expression of histidine decarboxylase in human colonic cancer cells and adenomatous polyps. *Inflamm Res*, 52 (Supplement 1): S76- S77. **IF: 1,498**
2. **Boér K**, Darvas Z, Bősze Sz, Schwelberger H, Baki M, Bélai F, Pál Zs, Falus A. (2004) Histamine metabolism and CD8 cell infiltration in colon adenomas. *Inflamm Res*, 53 (Supplement 1): S83- S84. **IF: 1,450**
3. **Boér K**, Helinger E, Helinger A, Pocza P, Pos Z, Demeter P, Baranyai Zs, Dede K, Darvas Zs, Falus A. (2008) Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine. *Eur J Cell Biol*, epub ahead of print. **IF: 3,039**
4. Hegyesi H, Colombo L, Pállinger E, Tóth S, **Boér K**, Molnár V, Falus A. (2007) Impact of systemic histamine deficiency on the crosstalk between mammary adenocarcinoma and T cells. *J Pharmacol Sci*, 105(1): 66-73. **IF: 1,592**
5. Penyige J, Farczadi E, **Boér K**, Kaszas I, Csomor J, Demeter P. (2007) A rare intestinal malignancy: mantle cell lymphoma. *Endoscopy*, 38: E123. **IF: 3,605**

1.2. Poszter prezentációk

1. **Boér K**, Darvas Zs, Pál Zs, Falus A. (2002) HDC immunoreactivity in human colon and breast cancer tissue samples. XXXI.st Meeting of the European Histamine Research Society. Eger (abstr).
2. **Boér K**, Darvas Zs, Pál Zs, Bősze Sz, Schwelberger H, Falus A. (2003) The comparison of histamine metabolism in healthy colon mucosa, colon adenoma and adenocarcinoma biopsy samples. XXXII Annual Meeting of the European Histamine Research Society, Noordwijkerhout (abstr).

3. Pál Zs, **Boér K**, Bősze Sz, Falus A, Darvas Zs. (2003) Hisztamin metabolizmus vizsgálata humán vastagbél tumorokban. A Magyar Onkológusok Társaságának XXV. Kongresszusa, Szeged (abstr).
4. Darvas Zs, **Boér K**, Falus A. (2004) A hisztamin és receptorainak szerepe humán tumorokban. Sejt és Fejlődésbiológiai Kongresszus. Pécs (abstr).
5. Darvas Zs, **Boér K**, Molnár B, Hellinger E, Hellinger A, Falus A. (2005) Histamine and its receptors in precancerous stages and in tumours. The comparison of histamine metabolism in healthy colon mucosa, XXXIV Annual Meeting of the European Histamine Research Society, Amsterdam (abstr).
6. **Boér K**, Penyige J, Hellinger A, Hellinger É, Falus A, Darvas Zs. (2005) A hisztamin és receptorainak szerepe a vastagbél adenomában és carcinomában. A Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa. Budapest (abstr).
7. Darvas Zs, **Boér K**, Pócza P, Helinger É, Helinger A, Kiséry N, Sente N, Falus A. (2007) Down regulation of histamine receptor in human colon cancer. European Histamine Research Society, Florence (abstr).

1.3. A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó megjelent közlemények és citálható abstractok:

1. **Boér K**, Lohinszky J, Szánthó J. (1998) Is there any place of 3rd and 4th line chemotherapy in advanced breast cancer (focus on gemcitabine). International Congress on Anti Cancer Treatment, Paris (abstr).
2. **Boér K**. Docetaxel az emlőrák adjuváns kezelésében. (2002) Pathology and Oncology Research Suppl, 2: 20-25.
3. **Boér K**, Láng I, Juhos É, Pintér T, Szántó J. (2003) Docetaxel kombinációs kezeléssel (TAC) szerzett tapasztalataink az emlőrák adjuváns kemoterápiájában BCIRG 001 randomizált, multicentrikus fázis III vizsgálat hazai eredményei. Magyar Onkológia, 47(2):142-148.
4. **Boér K**. Az emlőrák gyógyszeres kezelésének kérdései. (2004) Orvosi Hetilap, 143 (14): 725-730.
5. **Boér K**. Az emlődaganatok szisztémás gyógyszeres kezelése. (2004) Orvosi Hetilap, 145 (4): 187-192.

6. **Boér K**, Farczádi E, Lohinszky J, Zsolnay Z, Dobó I, Markó L, Szűcs M, Baki M. (2004) Experience with TAC (docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide) polychemotherapy in the neoadjuvant treatment of breast cancer (abstr). International Congress on Anti Cancer Treatment, Paris (abstr).
7. **Boér K**. Időskori emlődaganatok kezelésének lehetőségei. (2005) Orvosi Hetilap, 146(1): 15-21.
8. Pusztai P, Sárman B, Illés G, Székely E, Péter I, **Boér K**, Tihanyi T, Rác K. (2006) Hypercalcitoninemia in a patients with recurrent goitre and insulinoma: a case report. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 114: 217-221. **IF: 1,356**
9. Németh Zs, Farczádi E, **Boér K**. (2007) Kezdeti tapasztalataink pegfilgastrim szekunder profilaxissal. *Curr Opin Oncol Magyar Kiadás*, 3(1): 21-24.
10. **Boér K**, Láng I, Llombart-Cussac A, Andreasson I, Vivanco LG, Sanders N, Pover GM, Murray E. (2007) Vandetanib with docetaxel as second-line treatment for advanced breast cancer: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II study. San Antonio Breast Cancer Conference (abstr).
11. Láng I, Adenis A, **Boer K**, Escudero P, Kim T, Valladares M, Sanders N, Pover G, Douillard J. (2008) AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine in patients with metastatic colorectal cancer who have failed prior chemotherapy. American Society Cancer of Oncology, Annual Meeting (abstr).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Falus András egyetemi tanárnak, a Genetikai, Sejt- és Immunológiai Intézet igazgatójának és akadémikusnak hogy lehetővé tette az Intézetben folyó kutatási programhoz való csatlakozásomat. Tanácsaival mindvégig segítette munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Darvas Zsuzsanna egyetemi docensnek hogy megismertetett a hisztamin kutatás alapjaival, az ő segítségével szereztem meg a témához szükséges kutatói szemléletet.

Prof. Dr. Szántó János egyetemi tanár indította el tevékenységemet a tudományos munka terén, köszönöm, hogy lehetővé tette és támogatta kutatói munkámat.

Köszönöm Dr. Pócza Péter-nek az immunhisztokémiai munkákban nyújtott segítségét. Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Pós Zoltánnak a statisztikai feldolgozás magas színvonaláért.

Köszönettel tartozom Dr. Demeter Pál osztályvezető főorvos úrnak, akitől értékes tanácsokat kaptam, és aki lehetővé tette a minták gyűjtését. Dr. Penyige József és Dr. Béla Ferenc kollegáknak is köszönöm a minták gyűjtésében kifejtett aktív közreműködésüket. Köszönöm Dr. Kaszás Ilona és Dr. Zolnai Zsófia főorvosoknak a patológiai háttérben nyújtott segítségüket.

Kollégáim, barátaim – Dr. Farczádi Enikő, Dr. Farkas Elek, Dr. Németh Zsuzsanna, Dr. Pap Mária, Dr. Rumszauer Ágnes, – mindvégig segítettek a betegek ellátásában, és sokszor feladataimból is átvettek, hogy tudományos munkámat végezhessem.

Dr. Farkas Elek főorvos úrnak külön köszönöm a lektorálásban nyújtott fáradhatatlan segítségét. Köszönöm Baranyai István-nak a technikai segítséget.

Hálás vagyok családomnak, édesanyámnak és testvéremnek, akik biztos hátteret és nyugodt légkört biztosítva tették lehetővé, hogy elkészüljön ez a munka.

