

A gyomor- és nyelőcső nyálkahártya különféle tényezők hatására bekövetkezett sejtkinetikai változásainak immunhisztokémiai elemzése

Doktori tézisek

Dr. Hritz István

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hersényi László, Dr. Prónai László†
Programvezető: Dr. Tulassay Zsolt

Hivatalos bírálók: Dr. Schandl László
Dr. Lakatos Péter László

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalay Ferenc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Székely György
Dr. Patócs Attila

Budapest
2008

Bevezetés

A sejtek normális életciklusának biztosítása alapvető élettani szerepet játszik a gyomor- és nyelőcső nyálkahártya homeosztázisának fenntartásában. A folyamat egyensúlyának megbomlása a sejtfelszaporodás révén daganat kialakulásához, vagy sejtpusztulás következtében nyálkahártya károsodáshoz és fekély képződéshez vezethet.

A nem szteroid gyulladásgátlók (NSAID-szerek) a világon a legelterjedtebben alkalmazott gyógyszerek közé tartoznak. Kedvező klinikai hatásaik mellett alkalmazásuk során nyilvánvalóvá vált, hogy a betegeknek komoly kockázatot is jelenthetnek. Leggyakoribb mellékhatásuk az emésztőrendszer – ezen belül a gyomor-duodenum – nyálkahártyájának károsítása.

Az NSAID-szerek közös hatása a láz- és fájdalom csillapítás, valamint a gyulladás csökkentése a prosztaglandin szintézis gátlása révén. Az NSAID-szerek reverzibilisen vagy irreverzibilisen kötődhetnek a ciklooxygenáz (COX) enzimekhez. A COX-1 eredetű prosztaglandinok felelősek az emésztőrendszeri nyálkahártya- és sejt védelemért, míg a COX-2 eredetű prosztaglandinoknak fontos szerepük van a gyulladás, fájdalom és láz kialakulásában. A legtöbb NSAID-szer nem szelektív, azaz egyaránt gátolják a COX-1 és a COX-2 izoenzimet. A nem szelektív NSAID-szerek (ns-NSAID-szerek) káros emésztőrendszeri mellékhatása mindkét izoenzim gátlásából ered, amelyben a COX-1 izoenzim gátlása kulcsfontosságú.

Tartós NSAID szedés mellett az emésztőrendszeri mellékhatások megelőzésére egyidejű protonpumpa gátló (PPI) kezelés javasolt, azonban a gyomornyálkahártya sejtkinetikára gyakorolt hatásokról kevés információ áll rendelkezésünkre.

A PPI kezelés a proton pumpa (H^+/K^+ ATP-áz) szelektív gátlásával tartós hypochlorhydriát okoz. Tanulmányok igazolták, hogy az omeprazol hosszú távú szedése az epithel sejtekben reverzibilis módon növeli a proliferációt és csökkenti a sejt differenciálódást, jóllehet az irodalmi adatok ebben a tekintetben ellentmondásosak.

A Barrett-nyelőcsőre (BE) jellemző, hogy a nyelőcső többrétegű laphámját a distális nyelőcsőben columnaris, mirigyes metaplasztikus nyálkahártya helyettesíti, amely nyelőcső adenocarcinoma kialakulására hajlamosít. A BE tumoros elfajulása egy többlépcsős folyamat, amely korai molekuláris és morfológiai elváltozásokkal jár együtt.

A Barrett adenocarcinoma diagnózisát általában későn állítják fel, következésképpen a betegséget rossz prognózis jellemzi. A malignus elváltozás korai felismeréséhez és/vagy a dysplasia értékeléséhez igen fontos a malignus transzformáció szempontjából nagyobb kockázatú

betegek azonosítása. A szöveti biomarkerek vizsgálata fontos szerepet játszik a dysplasia értékelésében és BE esetében a malignus progresszió megítélésében.

A szekretoros leukocita proteáz inhibitor (SLPI) egy többfunkciós fehérje, amely antimikróbás és gyulladáscsökkentő hatással is rendelkezik és az emésztőrendszer nyálkahártyában is megtalálható. Az SLPI expresszió gyulladás során általában megnövekedik, jóllehet a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) asszociált gastritisre szignifikánsan csökkent antrum SLPI szint jellemző.

Célkitűzések

NSAID tanulmány

A gyomornyálkahártya sejtek kinetikájának, azaz a proliferáció és az apoptózis, ill. a p53- és az epithelialis növekedési faktor receptor (EGFR) expresszió változásainak vizsgálata tartós ns-NSAID- vagy szelektív COX-2-gátló kezelés valamint egyidejű PPI terápia hatására.

PPI tanulmány

A PPI kezelésnek a gyomornyálkahártya sejt proliferációra, apoptózisra, valamint a p53- és EGFR expresszióra kifejtett hatásának megbecsülése.

Barrett tanulmány

A nyelőcső malignus transzformációs folyamatának értékelése során a sejt proliferáció és p53 expresszió, illetve a glutation S-transzferáz (GST) és a matrix metalloproteináz-9 (MMP-9) expresszió vizsgálata, valamint ezen marker expressziók korrelációinak tanulmányozása a normális nyelőcső epithelium, reflux oesophagitis, BE, oesophagitisszel társuló BE, dysplasia és adenocarcinoma progresszív kialakulási kórfolyamatban.

SLPI tanulmány

A különféle etiológiájú krónikus gastritisben szenvedő betegek gyomornyálkahártya SLPI expressziójának vizsgálata.

Módszerek

NSAID tanulmány

Gyomor biopsziás mintát vettünk a tartósan ns-NSAID-szert vagy szelektív COX-2 gátlót szedő 10-10 beteg antrumából a PPI kezelés megkezdése előtt és hat hónappal a folyamatos kezelés után, valamint 10 egészséges kontrollból, akik nem szedtek semmilyen gyógyszert. A proliferációs sejt

nukleáris antigént (PCNA), az apoptózist, az EGFR- és a p53 expressziót immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk.

PPI tanulmány

Gastro-oesophagealis reflux betegekből gyomor biopsziás mintát vettünk az antrumból az omeprazol (n=14) vagy esomeprazol (n=12) terápia megkezdése előtt és hat hónappal a folyamatos kezelés után. A sejt proliferációt, apoptózist, EGFR- és p53 expressziót immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk.

Barrett tanulmány

A sejt proliferációt, p53-, GST- és MMP-9 expressziót immunhisztokémiai módszerekkel 51 paraffinba ágyazott szöveti mintában vizsgáltuk az alábbi csoportosításban: reflux oesophagitis (n=7), BE (n=14), oesophagitisszel társuló BE (n=8), Barrett dysplasia (n=7), nyelőcső adenocarcinoma (n=8) és egészséges kontroll csoport (n=7).

SLPI tanulmány

Az SLPI expressziót retrospektív módon, immunhisztokémiai módszerekkel, 85 paraffinba ágyazott szöveti mintában az alábbi csoportokban elemeztük: *H. pylori*-asszociált krónikus aktív gastritis (n=13), NSAID-szer okozta gastritis (n=18), autoimmun gastritis (n=11), lymphocytás gastritis (n=26) és egészséges kontroll csoport (n=17).

Az immunhisztokémiai festődés intenzitását szemikvantitatív módon számlálós-, vagy immunreaktivitási pontozós módszerrel elemeztük. Az adatok statisztikai elemzése egy-utas ANOVA, LSD teszt és korreláció analízis segítségével történt. Az értékeket átlag \pm SD formában fejeztük ki és a $p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

NSAID tanulmány

Míg a p53 expresszió emelkedik és az EGFR expresszió csökken, tartós ns-NSAID kezelés során a gyomornyálkahártya sejt proliferációját és apoptózisát tekintve egy növekedési tendencia figyelhető meg, a különbség azonban statisztikailag nem szignifikáns. Tartós szelektív COX-2 terápiát megemelkedett sejt proliferáció és csökkent EGFR expresszió jellemzi, amit nem kísér megnövekedett p53 expresszió, míg a gyomornyálkahártya apoptózisában egy növekedési tendencia figyelhető meg. Az egyidejű PPI

kezelés normalizálja a megzavart sejtkinetikát függetlenül attól, hogy ns-NSAID-, vagy COX-2 gátló terápiát alkalmaztunk.

PPI tanulmány

Hat hónapos PPI kezelés nem növeli statisztikailag szignifikáns módon a gyomornyálkahártya sejt proliferációt és az EGFR expressziót és nincs hatással az apoptózisra valamint a p53 expresszióra. Tartós omeprazol vagy esomeprazol kezelésnek a gyomornyálkahártya sejtek kinetikájára kifejtett hatásában nincs különbség. Jóllehet mindkét csoportban megfigyelhető egy növekedési tendencia a sejt proliferációban és az EGFR expresszióban, a különbség azonban statisztikailag nem szignifikáns. A PPI kezelés előtt és után, az alkalmazott PPI típusától függetlenül, különbség csak az immunhisztokémiai festődés denzitásának elhelyezkedésében igazolható.

Barrett tanulmány

Míg a sejt proliferáció szignifikánsan alacsonyabb a kontroll csoportban az összes többi csoportoz képest, nincs p53 expresszió növekedés a dysplasiát tekintve negatív nyelőcső mintákban, beleértve a BE-t és a reflux oesophagitist. A dysplasiát tekintve pozitív nyelőcső mintákat szignifikánsan magasabb sejt proliferáció és p53 expresszió jellemzi, mint a BE-t, reflux oesophagitist és az oesophagitisszel társuló BE-t. Mind a sejt proliferáció, mind a p53 expresszió szignifikánsan magasabb nyelőcső adenocarcinómában, mint BE-ban vagy dysplasiában. Míg az oesophagitisszel társuló BE-ban szignifikánsan magasabb a p53 expresszió mint BE-ban, reflux oesophagitisben vagy a kontroll csoportban, addig az oesophagitisszel társuló BE-ban, valamint a reflux oesophagitisben is szignifikánsan magasabb sejt proliferáció figyelhető meg a BE-hoz képest. A sejt proliferáció és p53 expresszió változása lineáris korrelációt mutat ($r=0.91$).

A GST expresszió szignifikánsan magasabb, míg az MMP-9 expresszió szignifikánsan alacsonyabb a kontroll csoportban a BE-hoz és a többi csoporthoz képest. A BE, reflux oesophagitis és oesophagitisszel társuló BE között nincs szignifikáns különbség. A dysplasiát tekintve pozitív nyelőcső mintákat és az adenocarcinómát szignifikánsan alacsonyabb GST- és magasabb MMP-9 expresszió jellemzi az összes többi csoporthoz képest. A nyelőcső adenocarcinoma alig mutat GST expressziót, míg szignifikánsan magasabb az MMP-9 szint a Barrett dysplasiához képest. A GST- és az MMP-9 expresszió változása fordított korrelációt mutat ($r=-0.82$).

SLPI tanulmány

A kontroll csoporthoz képest a gyomor antralis nyálkahártya SLPI expressziója szignifikánsan alacsonyabb *H. pylori*-asszociált gastritisben és lymphocitás gastritisben, míg az epitheliális SLPI expresszió mértékét az NSAID-okozta és az autoimmun gastritis nem befolyásolja, sem az antrumban, sem a corpusban. A *H. pylori*-asszociált gastritist és a lymphocitás gastritist az infiltráló immun sejtek szignifikánsan alacsonyabb SLPI expressziója jellemzi, míg autoimmun gastritisben a corpus infiltráló immun sejtekben szignifikánsan magasabb SLPI szint figyelhető meg, mint a többi csoportban.

Következtetések

NSAID tanulmány

- Tartós ns-NSAID kezelés során a p53 expresszió emelkedik, az EGFR expresszió pedig csökken
- Tartós szelektív COX-2 terápiát megemelkedett gyomornyálkahártya sejt proliferáció és csökkent EGFR expresszió jellemzi
- Egyidejű PPI kezelés normalizálja a megzavart sejtkinetikát függetlenül attól, hogy ns-NSAID-, vagy COX-2 gátló terápiát alkalmazunk
- Az NSAID-gastropathia kialakulása nagy valószínűséggel nincs összefüggésben az NSAID-szereknek a gyomornyálkahártya „sejt-turnover”-re kifejtett hatásával

PPI tanulmány

- Tartós omeprazol vagy esomeprazol kezelésnek a gyomornyálkahártya sejtek kinetikájára kifejtett hatásában nincs különbség
- Hat hónapos PPI kezelés nincs összefüggésben a gyomornyálkahártya „sejt-turnover” rendellenességeivel
- Különbség csak a PCNA és EGFR immunhisztokémiai festődés denzitásának elhelyezkedésében mutatkozik PPI kezelés előtt és után
- A PPI kezelés során dysplasia kialakulásának kockázata nem valószínűsíthető

Barrett tanulmány

- A megemelkedett p53 expresszió jellegzetes eltérés a BE malignus elfajulása során, amely fokozódik a szövettani progresszióval

- A sejt proliferáció növekszik a Barrett-epitheliumban kialakuló dysplasia fokával és egyenesen arányos a p53 expresszióval
- Az egyidejűleg megnövekedett sejt proliferáció és fokozott p53 expresszió erősen valószínűsíti összefüggésüket a nyelőcső daganat kialakulásában és sajátos szerepüket a nyelőcső adenocarcinoma biológiájában
- A GST expresszió csökken, míg az MMP-9 expresszió növekszik a reflux oesophagitis-BE-dysplasia-adenocarcinoma progresszív kórfolyamat során
- A GST expresszió csökkenése és az MMP-9 emelkedése sajátos szerepet játszhat a többlépcsős nyelőcső carcinogenesisben és a BE malignus progressziójában
- Ezen biológiai markerek vizsgálata BE-ban hasznos lehet a nyelőcső adenocarcinoma kialakulása szempontjából nagyobb kockázatú betegek azonosításában

SLPI tanulmány

- *H. pylori*-asszociált gastritisben és lymphocitás gastritisben a gyomornyálkahártya SLPI immunhisztokémiai festődése erősen csökkent, olykor alig mutatható ki
- Az epitheliális SLPI expresszió mértékét az NSAID-okozta és az autoimmun gastritis nem befolyásolja
- A csökkent SLPI expresszió a *H. pylori* fertőzés sajátos jellemvonása és nem a gyomor gyulladáshoz vezető folyamatának általános jelensége

Az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó saját publikációk

Hritz I, Molnar B, Gyorffy H, Lakatos G, Sipos F, Pregun I, Juhasz M, Pronai L, Schaff Z, Tulassay Z, Herszenyi L. p53 expression in the malignant transformation of Barrett's esophagus increases with histological progression and is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment. (folyamatban)

Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. A protonpumpagátlók hatása a gyomornyálkahártya sejtkinetikájára tartós nem szteroid gyulladásgátló kezelés során. LAM. 2007;17(11):802-803.

Herszenyi 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 February 7;13(5):676-682.

Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Pronai L, Tulassay Z. The effect of proton pump inhibitor therapy on gastric epithelial cell kinetics. Magy Belorv Arch. 2006;61:187-191.

Wex T, Treiber G, Venerito M, Leodolter A, Peitz U, Kuester D, **Hritz I**, Krueger S, Roessner A, Malfertheiner P. Helicobacter pylori-induced downregulation of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in gastric epithelial cell lines and its functional relevance for H. pylori-mediated diseases. Biol Chem. 2006 Jul;387(7):893-901.

IF: 2.58

Hritz I, Kuester D, Vieth M, Herszenyi L, Stolte M, Roessner A, Tulassay Z, Wex T, Malfertheiner P. Secretory leukocyte protease inhibitor expression in various types of gastritis: a specific role of Helicobacter pylori infection. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2006;18(3):277-82.

IF: 1.69

Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and has no effect on apoptosis and p53 expression. World J Gastroenterol. 2005;11(30):4721-6.

Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai 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(1):75-84.

IF: 3.42

Egyéb publikációk

Hritz I, Herszenyi L, Lakatos G, Pronai L, Tulassay Z. A nyelőcső rosszindulatú daganatai: kóreredet, diagnózis és kezelés *Orvoskepes.* 2006;1:11-20.

Hritz I, Pronai L, Szalay F, Tulassay Z. Management of reflux disease in clinical practice in Hungary. *Z Gastroenterol.* 2005;43(6):575-80.

IF: 0.8

Pronai L, **Hritz I**, Molnar B, Herszenyi L, Tulassay Z. COX-2 selective inhibitors (coxibs): Gastrointestinal safety. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003;16(2 Suppl):23-30.

IF: 3.42

Absztraktok

Hritz I, Wex T, Herszenyi L, Tulassay Z, Malfertheiner P. Secretory leucocyte protease inhibitor in various types of gastritis- a specific role of *H. pylori* infection. *Z Gastroenterol.* 2006;43:411-458; A 48.

Lakatos G, Herszenyi L, Juhasz M, Miheller P, **Hritz I**, Pregon I, Nemeth A, Tulassay Z. The incidence of *Helicobacter pylori* infection, gastroduodenal ulcers and gastro-esophageal reflux disease between 2002 and 2005. *Z Gastroenterol.* 2006;43:411-458; A 67.

Nemeth A, Lakatos G, Herszenyi L, Czintner D, Juhasz M, **Hritz I**, Pregon 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.

Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, **Hritz I**, Gyorffy B, Molnar 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.

Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, Gyorffy B, **Hritz I**, Pregun I, Molnar 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;Volume 130, Issue 4 (Suppl. 2): A-488.

Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, **Hritz I**, Molnar B, Tulassay Z. Correlation between matrix metalloproteinase-9 immunohistochemistry and mRNA expression array results in colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2006;17(Suppl. 6): vi40-41.

Hritz I, Herszenyi L, Molnar 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.

Herszenyi L, **Hritz I**, Molnar 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.

Lakatos G, Herszenyi L, **Hritz I**, Juhasz M, Miheller P, Pregun I, Molnar B, Nemeth A, Tulassay Z. Hiatal hernia, reflux esophagitis and Barrett's esophagus: endoscopic correlation. *Z Gastroenterol*. 2005;43:477-529; A 67.

Herszenyi L, **Hritz I**, Molnar B, Pronai 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.

Hritz I, Molnar B, Herszenyi L, Tulassay Z, Pronai 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 May;42: A416 Suppl.

Lakatos G, Herszenyi L, **Hritz I**, Tulassay Z, Pronai L. Barrett's esophagus – A follow up study. *Z Gastroenterol*. 2004 May;42: A422 Suppl.

Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, Pronai L, Juhasz M, **Hritz I**, Molnar B, Tulassay Z. mRNA expression array data correlates to the MMP-9 protein expression in colorectal biopsies. *Z Gastroenterol.* 2004 May;42: A415 Suppl.

Hritz I, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. Proton pump inhibitor co-therapy normalizes the altered cell kinetics in chronic NSAID users. *Z Gastroenterol.* 2003 May;41: A440 Suppl.

Pronai L, **Hritz I**, Molnar B, Tulassay Z. Diverse effect of cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) inhibitor therapy on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis – Proton pump inhibitor (PPI) co-therapy normalizes the altered cell kinetics. *Gastroenterology.* 2003 Apr;124 (4): A601-A601 Suppl.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt feleségemnek, Viktóriának, szeretném kifejezni hálámat, végtelen türelméért, szeretetért és megértésért. Az Ő hozzájárulása nem méltányolható eléggé.

Köszönöm családomnak, elsősorban szüleimnek, hogy mindvégig biztosították számomra a biztos hátteret és támaszaim voltak tanulmányaim során.

Megkülönböztetett hálával és köszönettel tartozom Dr. Tulassay Zsolt Professzor Úrnak folyamatos támogatásáért, nélkülözhetetlen tanácsaiért és bizalmáért, hogy csatlakozhattam a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika kutató és klinikai csoportjához.

Hálámat fejezem ki mentoromnak, Dr. Hersényi Lászlónak, akinek támogatása, ösztönző tanácsai és bátorítása mindenkor megsegít.

Megkülönböztetett hálával tartozom korábbi mentoromnak, Dr. Prónai Lászlónak, hogy kijelölte számomra a helyes utat és értékes tanácsaival, valamint kivételes humorérzékével mindig segített megbirkózni az aktuális nehézségekkel. Emlékét mélyen őrzöm szívemben.

Továbbiakban, köszönöm Dr. Molnár Bélának a lehetőséget, hogy a Sejtanalitika Laboratóriumban kutató munkát végezhettem és Dr. Sipos Ferencnek és Kónya Gabriellának, hogy megtanítottak az immunhisztokémiai módszerek alapjaira.

Hálámat fejezem ki Dr. Peter Malfertheiner Professzor Úrnak, hogy csatlakozhattam az Otto-von-Guericke Egyetem Gasztroenterológia, Hepatológia és Fertőző Betegségek Klinikáján, Magdeburgban a Dr. Thomas Wex vezette kutató csoporthoz. Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindkettőjük segítségéért, támogatásáért és az értékes tanácsokért a három hónapos tartózkodásom során.

Köszönettel tartozom a megjelent dolgozatokban szereplő összes szerzőtársnak.

Végül, köszönetemet fejezem ki kollegáimnak mindennapi segítségükért.