

A CYP24A1 gén expresszió vizsgálata a kolorektális tumorgenezis különböző fázisaiban

Doktori tézisek

Dr. Horváth Henrik Csaba

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Speer Gábor egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. med. habil. Herszényi László egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Rácz István egyetemi magántanár, DSc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. med. habil. Sasvári Mária egyetemi tanár, Dsc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Bodoky György egyetemi magántanár, DSc.
Dr. Juhász Márk egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2010

1. BEVEZETÉS

A betegség kórfolyamatának és jellegzetességeinek megismerésében az elmúlt évtizedekben elért jelentős előrelépés ellenére a vastagbélrák súlyos népegészségügyi problémát jelent napjainkban. A vastagbélrák a világon továbbra is a második leggyakoribb rosszindulatú daganatos megbetegedés. Magyarországon évente kb. 9000 új eset válik ismertté és mintegy 5000 honfitársunk hal meg vastagbélrák következtében. A betegség kialakulásában a genetikai tényezők mellett környezeti faktorok játszanak szerepet. A vastagbélrákok előfordulási gyakorisága az UV-B sugárzás mértéke közötti fordított összefüggés alapján felmerült, hogy a D vitaminnak protektív szerepe lehet a vastagbélrákok kialakulásában. Utánkövetéses vizsgálatok során az alacsony szérumszintű 25OHD₃ vitaminszint a jó- és rosszindulatú vastagbél-daganatok kialakulásának és a vastagbélrákok progressziójának fokozott relatív kockázatával járt.

Az aktív D vitamin, az 1,25(OH)₂D₃ a kalcium- és foszfor-anyagcsere egyensúlyának, a csontok normális fejlődésének biztosításán és fenntartásán túl számos, ún. nem kalciotróp hatással is rendelkezik. Ezek közül a terápiás felhasználás szempontjából legígéretesebb, hogy az aktív D vitamin az intranukleáris D vitamin receptorokon (VDR) keresztül hatva, számos jelátviteli út közreműködésével a sejtszaporodás, –differentiáció és az apoptózis szabályozásában is részt vesz.

Számos emberi szövetben, így vastagbélben is igazolták a lokális D vitamin anyagcsere jelenlétét. Sejtenyészetekben és állatkísérletekben a vastagbélben lokálisan termelődő 1,25(OH)₂D₃ auto- ill. parakrin módon hatva gátolja a tumorgenezist és –progressziót. Humán vastagbél-szövetben a helyi D vitaminhatások kialakulásáért a szervezet D vitamin ellátottságát jellemző szérumszintű 25OHD₃ vitaminszint mellett az 1,25(OH)₂D₃ szintézisét végző CYP27B1 és lebontásáért felelős CYP24A1 enzimek aktivitása mérvadó.

A CYP24A1 gén expressziója kitüntetett jelentőséggel bír a lokális 1,25(OH)₂D₃-szint szabályozásában, ezért a kolorektális tumorgenezis különböző stádiumaiban történő vizsgálata lehetővé teszi a vastagbélben zajló D vitamin anyagcsere jobb megértését. A CYP24A1 génexpresszió a vastagbél-daganatok kialakulásának és progressziójának molekuláris mechanizmusában játszott szerepének pontosabb megismerése lehetőséget teremt a D vitamin felhasználására a daganatok megelőzésében és a kezelésében is.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célkitűzései a következők voltak:

1. A CYP24A1 gén expressziójának és az enzimfehérje jelenlétének vizsgálata a kolorektális tumorgenezis különböző fázisait reprezentáló (ép nyálkahártya - benignus lézió - adenocarcinoma) humán vastagbél szövetmintákban.
2. A CYP24A1 expresszió és a malignus daganatok kliniko-patológiai paraméterei közötti összefüggés vizsgálata.
3. A CYP24A1, a CYP27B1 és VDR gén expresszió összefüggésének vizsgálata a kolorektális tumorgenezis különböző fázisait reprezentáló humán vastagbél szövetmintákban.
4. A CYP24A1 enzimfehérje jelenlétének összefüggése a sejtek proliferációját jellemző Ki 67 markerrel.
5. A CYP24A1 enzim hasítási variáns(ok) jelenlétének vizsgálata humán vastagbél nyálkahártyában. Vizsgáltuk a hasítási variánsok előfordulási gyakorisága és a minta szövettani típusa valamint a klinikai paraméterek közötti kapcsolatot.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek és a szövettani minták

A CYP24A1 expresszió vizsgálatához összesen 111 szövetmintát (15 ép nyálkahártya, 48 benignus, 48 malignus vastagbél-daganat) használtunk fel, melyet a diagnosztikus célú rutin vastagbél-tükrözés során nyertünk a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikáján. A minta egyik feléből RNS izolálás történt, míg a bioptátum formaldehidben tárolt másik feléből a paraffinba ágyazást követően hagyományos szövettani metszet készült.

A CYP24A1 hasítási variánsok vizsgálatához összesen 122 betegtől származó tumor (33 benignus, 89 malignus) és ép nyálkahártya bioptátumon végeztük el. 50 betegtől a Semmelweis Egyetem I. Sz. Belgyógyászati Klinikájának endoszkópos laborjában végzett vastagbél-tükrözés során történt mintavétel, 72 beteg esetén a minták a bécsi Rudolfstiftung Kórházban történt műtét rezekátumaiból származott.

A mintavétel a Semmelweis Egyetem Tudományos Kutatásetikai Bizottságának és a bécsi Orvostudományi Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt (TUKEB 179/2007 ill. EK 06-198-VK).

3.2. Valós idejű reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció (valós idejű RT-PCR)

RNS izolálás a bioptátumok esetén RNEasy Minikittel történt, míg műtési rezekátumok esetén az RNS kinyeréséhez TRIzol oldatot használtunk. Csak az RNáz-mentes 1%-os agaróz gélen történő futtatás során szabályos 18S és 28S riboszómális RNS-mintázatot mutató próbákat használtuk fel a további vizsgálatokhoz. A valós idejű RT-PCR vizsgálathoz 5 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé random hexamer primerek és Moloney Murine leukémia vírus (M-MLV) reverz transzkriptáz segítségével a gyártó utasítása szerint.

3.2.1. A VDR, CYP27B1 és CYP24A1 génexpresszió vizsgálata

A humán VDR, CYP27B1 és CYP24A1 génexpresszió összehasonlító vizsgálatát komparatív $\Delta\Delta C_T$ módszerrel végeztük POWER SYBR[®] Green PCR Master Mix és az ABI StepOnePlus Realtime PCR System felhasználásával. Mintáinkban a vizsgált gének expressziós mértékének kiszámításakor az endogén kontrollként használt béta-aktin expresszió mértékével normalizált értékeket használtuk. Kallibrátorként ép vastagbél nyálkahártya mintákból származó cDNS-keveréket alkalmaztunk, a minták génexpressziós értékeit ehhez viszonyítottuk.

3.2.2. A CYP24A1 hasítási variánsok vizsgálata

A vastagbél-nyálkahártya mintákban előforduló hasítási variánsok kimutatására a 12 exonból felépülő CYP24A1 teljes mRNS szekvenciáját „lefedő” 6 primer párból (A-F) álló panelt használtunk, az amplifikációt Taq polimerázzal, MyCycler™ thermal cycler készüléken végeztük. A hasítási variánst eredményező amplifikáció esetén a PCR-termékek szekvenálását követően Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 segítségével, ABI Prism 310 Genetic Analyzer készüléken végeztük.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

3.3.1. A CYP24A1 és VDR indirekt immunhisztokémiai vizsgálata

A CYP24A1 és a VDR fehérje kimutatása kézi festéssel történt, melyhez hagyományos paraffinba ágyazott 5 µm vastag metszeteket használtunk. Deparaffinálást követően endogén peroxidáz és antigén feltárást végeztünk, melyet kettős festés esetén endogén alkalikus foszfatáz blokkolással egészítettünk ki. A CYP24A1 immunfestés során Ultavision LP Detecting System-et használtunk, az elsődleges ellenanyag poliklonális, nyúlban készült anti-humán CYP24A1 antitest volt. Kettős festés esetén a CYP24A1 vizualizálását követően a metszeteket nyúl szérummal blokkoltuk, majd monoklonális, patkányban termelt anti-humán VDR antitestet alkalmaztunk. A másodlagos antitestként használt nyúlban termelt patkányellenes, biotinilált immunglobulint streptavidin-alkalikus foszfatáz konjugátummal inkubáltuk. A kötődések vizualizálását CYP24A1 esetén DAB-kromogénnel, VDR esetén permanens vörös festéssel végeztük, háttérfestésként hematoxillint használtunk.

Az immunhisztokémiai festés értékelése szemikvantitatív módon történt. Véletlenszerűen kiválasztott 10 különböző látótérben 500 sejtet számoltunk meg 40x nagyításban. A festődés mértékét a következő módon osztályoztuk: nincsen festődés (negatív), enyhén pozitív (+), mérsékelten pozitív (++) , erősen pozitív (+++).

3.3.2. Ki 67 indirekt immunhisztokémiai vizsgálata

A Ki 67 kimutatására a paraffinba ágyazott metszeteket Ventana ES automatával festettük. Elsődleges ellenanyagként egérben termelt anti-humán Ki 67 antitestet használtunk, a vizualizáció DAB kromogénnel történt.

A festődés értékelését fénymikroszkóppal (40x nagyításban) szemikvantitatív módon végeztük. 10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben látóterenként 1000 sejtet megvizsgálva a festődést mutató sejtmaggal rendelkező sejtek aránya alapján határoztuk meg a Ki 67

expresszió mértékét: 0 (0-5% pozitív), 1 (6-20% pozitív), 2 (21-40% pozitív), 3 (41-60% pozitív), 4 (61-80% pozitív), 5 (81-100% pozitív).

3.4. Statisztikai kiértékelés

A valós idejű RT-PCR vizsgálat során meghatározott expresszió mértéke és a minta szövettani típusa (ép, benignus lézió, adenocarcinoma) közötti összefüggés vizsgálatát kétmintás t-próbával végeztük. A klinikai és a szövettani paraméterek valamint az immunfestéssel meghatározott expressziók és a hasítási variánsok előfordulása közötti összefüggést Chi négyzet próbával vizsgáltuk. Többszörös összehasonlítás esetén a Hockberg-féle eljárást alkalmaztuk. A CYP24A1 és a Ki 67 fehérje expresszió valamint a CYP24A1 hasítási variánsainak előfordulása és a kliniko-patológiai adatok közötti összefüggés vizsgálatához Spearman-féle rang korrelációs analízist végeztünk. A szignifikancia szintet minden kiértékelésnél $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. A statisztikai számításokat Microsoft Windows SPSS 16.0 szoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A CYP24A1 mRNS expresszió vizsgálata valós idejű RT-PCR-rel

A vizsgált mintákat három csoportba osztottuk: ép vastagbél-nyálkahártya, benignus lézió és adenocarcinoma. A CYP24A1 mRNA expresszió mértéke szignifikánsan nagyobb mind a benignus lézió, mind az adenocarcinoma csoportban az ép vastagbél-nyálkahártyához képest. A CYP27B1 expresszió mértéke a jóindulatú daganatokban magasabb, rosszindulatú vastagbeldaganatok esetében alacsonyabb volt az ép nyálkahártyához képest, azonban a különbség a vizsgált mintákban nem volt szignifikáns. Ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb VDR expresszió volt detektálható mindkét daganatos csoportban a normál vastagbél-nyálkahártyához képest. (1. táblázat)

	VDR	CYP27B1	CYP24A1
Ép nyálkahártya	0,749 ± 0,05	2,261 ± 0,92	1,353 ± 0,38
Benignus lézió	0,455 ± 0,06***	2,365 ± 0,90	11,93 ± 5,77*
Adenocarcinoma	0,412 ± 0,07***	1,183 ± 0,50	3,876 ± 1,41*

1. táblázat. A VDR, a CYP27B1 és a CYP24A1 mRNS expresszió valós idejű RT-PCR vizsgálat során meghatározott értéke \pm SEM ép vastagbél-nyálkahártyában, benignus vastagbeldaganatokban és adenokarcinómában. * $p < 0.05$ és *** $p < 0.001$.

4.2. A CYP24A1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata

Az immunfestés alapján jelentős különbségek figyelhetők meg a CYP24A1 enzim jelenléte tekintetében a vizsgált szövettani csoportok között. Nem vagy alig kimutatható a CYP24A1 fehérje ép vastagbél-nyálkahártyában, míg enyhe festődés található a jóindulatú daganatok többségében. Ezzel szemben a CYP24A1 enzim expressziója kifejezett adenokarcinómákban (2. táblázat). A vizsgált csoportokban a CYP24A1 expresszió mértéke szignifikánsan különbözik ($p < 0,05$).

Szövettani diagnózis	CYP24A1 expresszió mértéke			
	Negatív	+	++	+++
Ép nyálkahártya (n)	6	5	2	2
Benignus lézió (n)	31	6	4	7
Adenocarcinoma (n)	9	6	18	15

Összesen (n)	46	17	24	24
Chi négyzet próba	* $p < 0,05$			

2. táblázat. A CYP24A1 enzim expressziója ép vastagbél-nyálkahártya, benignus lézió és adenocarcinoma metszeteken. (n=esetszám)

4.3. A betegek klinikai paramétereit, a daganat patomorfológiai jellegzetességeit és a CYP24A1 expresszió közötti összefüggés vizsgálata

Az adenocarcinoma mintákon megvizsgáltuk, van-e összefüggés a beteg klinikai paramétereit valamint a daganat hisztopatológiai sajátosságai és a CYP24A1 enzim expressziója között. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns összefüggést a betegek neme, kora és a CYP24A1 expresszió mértéke között. A daganat szövettani paramétereit (TNM-stádium, grade, a daganatban észlelt nekrozis jelenléte, az érbetörés, a perifokális gyulladás mértéke) sem mutattak összefüggést a CYP24A1 expresszió mértékével.

4.4. A CYP24A1 és a Ki67 expresszió összefüggésének vizsgálata

Mintáinkban a CYP24A1 és a Ki67 expressziója egymással korrelál, a statisztikai analízis szignifikáns pozitív korrelációt igazolt ($r_s=0,376$ $p<0,001$).

4.5. CYP24A1 hasítási variánsok kimutatása humán vastagbélben

Vizsgálati anyagunkban négy bázispárral (A: exon 1-2, B: exon 1-4, D: exon 3-7, E: exon 7-9) primer párokkal történt amplifikáció során a vad típusú CYP24A1 mRNS-nek megfelelő PCR-termékeket kaptuk, hasítási variánsok (SV-k) nem voltak kimutathatóak.

Bár az C primer párral (intron 2-exon 4) végzett amplifikáció során ép hasítás esetén nem keletkezhet PCR-termék, a C primer párt tartalmazó PCR-reakciók azonban vizsgálati anyagunkban a CYP24A1 enzim két hasítási variánsát eredményezték. A 428 bp hosszúságú hasítási variánst (SV1) 20 ép nyálkahártyából (16,2%), 10 (30,3%) benignus lézióból és 32 (35,6%) adenokarcinómából származó mintában találtuk meg. A másik, 219 bp nagyságú hasítási variáns (SV2) 16 (13,0%) ép nyálkahártya, 8 (24,2%) jóindulatú és 22 (24,4%) rosszindulatú daganatos mintában volt jelen. Az SV1 szekvencia-analízise igazolta, hogy egy korábban humán myelomonocyta-sejtekben leírt, a 2-es intronon egy alternatív transzlációs start kodont tartalmazó hasítási variánsról van szó. A másik PCR-termék (SV2) egy korábban leírásra nem került hasítási variáns, melyből hiányzik a 2-es intron egy 209 bp hosszúságú fragmense, de ez az SV is tartalmazza a fenti alternatív transzlációs start kodont.

Az F primer párral (exon 9-11) történt amplifikáció során a várt 283 bp nagyságú a vad típusú enzimnek megfelelő PCR-termék mellett egy 85 bp hosszúságú hasítási variáns (SV3) is kimutatható volt 19 (15,4%) normál, 1 (3,1%) polyp és 20 (22,2%) adenocarcinoma mintában. A szekvencia vizsgálat alapján ez a hasítási variáns a 9-es exon 3' és a 11-es exon 5' végén lévő szekvenciákat tartalmazza, de nem tartalmazza a 10-es exont.

4.6. A CYP24A1 hasítási variánsok összefüggése a vizsgált minta szövettani típusával és a klinikai paraméterekkel

A vizsgált minta szövettani típusa és a különböző hasítási variánsok jelenléte közötti összefüggést megvizsgálva szignifikáns különbség mutatkozott a SV1 különböző szövettani típusú mintában való jelenléte között ($p < 0,002$). A rang korrelációs vizsgálat alapján mind az SV1 ($r_s = 0,216$ $p = 0,001$) mind pedig az SV2 ($r_s = 0,146$ $p = 0,02$) előfordulási gyakorisága a minta szövettani típusával (ép-benignus lézió-adenocarcinoma) szignifikáns összefüggést mutatott. Az SV3 megjelenése független volt a minta hisztopatológiai típusától.

A beteg klinikai paramétereivel való kapcsolat vizsgálatakor szignifikáns különbséget találtunk a SV2 két nemben való előfordulása között ($p < 0,002$). Ez a splice variáns előfordulása pozitív korrelációt mutatott a női nemmel ($r_s = 0,200$, $p = 0,001$). Férfiakban viszont az SV3 előfordulása volt szignifikánsan gyakoribb ($r_s = 0,150$, $p = 0,022$). A SV1 és SV2 együttes előfordulása volt megfigyelhető ($r_s = 0,732$, $p = 0,000$). Ugyanakkor nem volt kimutatható összefüggés a beteg kora, a daganat lokalizációja és malignitási foka (grade) között.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeinket összefoglalva a következő következtetéseket vonhatjuk le:

1. A kolorektális tumorgenezis során az aktív D₃ vitamin lokális anyagcseréjében meghatározó szerepet játszó CYP24A1 enzim expressziója kórosan változik. Az expresszió mRNS és protein szinten is növekszik adenómákban és adenokarcinómákban az ép nyálkahártyához képest. Az 1,25(OH)₂D₃ lebontó enzimének mennyiségi változása arra utal, hogy a daganatképződés során csökken az 1,25(OH)₂D₃ lokális szintje és ezáltal a kifejtett tumorelles hatása.
2. CYP24A1 expresszió mértéke nem mutat összefüggést a beteg korával, nemével, a daganat TNM-stádiumával és patológiai jellemzőivel (grade, necrosis, érbetörés, perifocalis gyulladás).
3. A D vitamin anyagcsere másik kulcsenzime, a CYP27B1 enzim expresszió mértéke trendszerű csökkenést mutat rosszindulatú vastagbél-daganatokban. A D vitaminhatások közvetítésért felelős VDR expressziós szintje szignifikánsan csökkent mind jó- mind rosszindulatú vastagbél-daganatokban az ép nyálkahártyához képest. A CYP27B1 és VDR expresszió mértéke alapján elmondható, hogy a CYP24A1 enzim fokozott expressziója a fizioiógias szabályozó mechanizmusoktól függetlenül következik be a kolorektális tumorgenezis folyamán.
4. A vastagbél-daganatok kialakulása során a CYP24A1 és a Ki 67 proliferációs marker szoros korrelációt mutat egymással. Ez a pozitív összefüggés megerősíti azt a feltevésünket, hogy az aktív D₃ vitamin sejtproliferációt gátló hatása fokozatosan elvész lebontó enzimjének egyre fokozódó expressziója következtében. Az aktív D₃ vitamin tumorelles hatásának csökkenése egyike lehet azon mechanizmusoknak, melyek előidéznek illetve fenntartják a malignus sejtburjánzást.
5. Elsőként bizonyítottuk, hogy a CYP24A1 enzim hasítási variánsai megtalálhatók humán vastagbél-szövetben.
6. Kimutattuk, hogy a CYP24A1 enzim hasítási variánsai előfordulási gyakorisága különbözik az egyes vizsgált szövettani típusokban. A hasítási variánsok az ép nyálkahártyához képest gyakrabban fordulnak elő adenómákban és adenokarcinómákban. Az alternatív hasítás következtében a vadtypustól eltérő szerkezeti felépítésű és enzimatisus aktivitású hasítási variánsok szerepet játszhatnak a D vitamin anyagcsere befolyásolásán keresztül a vastagbél-nyálkahártyában érvényesülő lokális D vitaminhatások kialakításában. A hasítási variánsok biológiai szerepének tisztázása további vizsgálatokat tesz szükségessé.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1 A doktori értekezés témájával összefüggő közlemények

Horvath HC, Khabir Z, Nittke T, Gruber S, Speer G, Bonner S, Manhardt T, Kállay E. (2010) CYP24A1 Splice Variants – Implications for the Antitumorigenic Actions of 1,25-(OH)₂D₃ in Colorectal Cancer. J Steroid Biochem and Mol Biol Közlésre elfogadva

IF (2008): 2.827

Horváth HC, Lakatos P, Kósa JP, Bácsi K, Borka K, Bises G, Nittke T, Hershberger PA, Speer G, Kállay E. (2010): The candidate oncogene CYP24A1: a potential biomarker for colorectal tumorigenesis. J Histochem Cytochem 58(3):277-285.

IF (2008): 2.823

6.2. Egyéb közlemények

Szendrói A, Speer G, Tabák A, Kósa JP, **Horvath HC**, Romics I, Lakatos P: The role of estrogen, vitamin D, calcium sensing receptor genotypes and serum calcium in the pathogenesis of prostate cancer. (2009) Uroonkológia 6:40-47.

A cukorbetegség emésztőrendszeri szövődményei. Kommentár. Orvostovábbképző Szemle 2009. március XVI. évfolyam 3. szám: 40-42.

Szamosi T, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group, Szilvasi A, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szabo O, Satori A, Tulassay Z, Miheller P, **Horvath HC**, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. (2009) The 3'UTR NFKBIA variant is associated with extensive colitis in Hungarian IBD patients. Dig Dis Sci, 54(2):351-359. IF: 1.583

Bácsi K, Kósa JP, Lazáry Á, Balla B, **Horvath HC**, Kis A, Nagy Z, Takács I, Lakatos P, Speer G. (2009) LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women. Osteoporosis International, 20(4):639-645.

IF: 4.290

Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, **Horvath HC**, Lazáry Á, Lakatos PL, Balla B, Budai B, Lakatos P, Speer G. (2008) Effects of the lactase gene 13910 C/T and calcium-sensing receptor gene A986S G/T polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian patients. BMC Cancer, 8:317-324. IF: 3.080

Lakatos PL, Fuszek P, **Horvath HC**, Zubek L, Haller P, Papp J. (2008) Double-balloon enteroscopy for the diagnosis and treatment of obscure belleding, inflammatory bowel disease and polyposis syndromes: we see more but do we know more? Hepato-gastroenterology, 55(81):133-137. IF .680

A Helicobacter pylori fertőzés korszerű kezelése. Kommentár. Orvostovábbképző Szemle 2007. december XIV. évfolyam 12. szám: 79-82.

Bácsi K, Kósa J, Lazáry Á, **Horváth HC**, Balla B, Lakatos P, Speer G. (2007) A dehidroepiandroszteron és dehidroepiandroszteron szulfát jelentősége különböző kórállapotokban. Orv Hetil, 14:649-655.

Bácsi K, Kósa J, Lazáry Á, Balla B, **Horváth H**, Takács I, Nagy Zs, Speer G, Lakatos P. (2007) A CYP3A7*1C polimorfizmus hatása a csont ásványanyag tartalmára posztmenopauzás nőkben. Orv Hetil, 148:1273-1280.

Lakatos PL, Fuszek P, **Horvath HC**, Zubek L, Papp J. (2006) A kettős ballon endoszkópia szerepe a vékonybél betegségeinek diagnózisában és kezelésében: kezdeti tapasztalataink az első 25 vizsgálat során. Orv Hetil, 147(40):1939-1944.

Fuszek P, **Horvath HC**, Speer G, Papp J, Haller P, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Hitre E, Lakatos PL. (2006) A colorectalis rákok lokalizációjának változása Magyarországon 1993 és 2004 között. Orv Hetil, 147(16):741-746.

Fuszek P, **Horvath HC**, Speer G, Papp J, Haller P, Fischer S, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Hitre E, Lakatos PL. (2006) Location and age at onset of colorectal cancer in Hungarian patients between 1993 and 2004. The high number of advanced cases supports the need for a colorectal cancer screening program in Hungary. Anticancer Res, 26(1B):527-531. IF: 1.479

Fuszek P, Lakatos P, Tabak A, Papp J, Nagy Z, Takacs I, **Horvath HC**, Lakatos PL, Speer G. (2004) Relationship between serum calcium and CA 19-9 levels in colorectal cancer. World J Gastroenterol, 10 (13):1890-1892. IF: 3.318

Nierhoff D, **Horvath HC**, Mytilineos J, Golling M, Bud O, Klar E, Opelz G, Voso MT, Ho AD, Haas R, Hohaus S. (2000) Microchimerism in bone marrow-derived CD34(+) cells of patients after liver transplantation. Blood, 96(2):763-767. IF 8.977

Horvath HC, Barna I. (2001) A pulzusnyomás változása normotóniás egyéneknél és hipertóniás betegekben. Hypertonia és Nephrologia, 6:55-63.

Kronqvist P, Kuopio T, Collan Y, **Horvath HC**, Tamm Ü (1997) The reproducibility of nuclear morphometric measurements in invasive breast cancer. Analytical Cellular Pathology 15: 47-49.

Horvath HC. (1997) The importance of nuclear area as a prognosticator in ductal infiltrative breast cancer. Prognostication and Cancer 2:32-41.

6.3. Idézhető absztraktok

Fuszek P, **Horváth HC**, Zubek L, Papp J, Lakatos PL. (2007) Double-balloon enteroscopy for the diagnosis and treatment of obscure bleeding, inflammatory bowel diseases and polyposis syndromes: An eastern european experience in 74 examinations. Gut 56 (Suppl III) A 382
IF: 10,015

Lakatos PL, Fuszek P, **Horváth H**, Zubek L, Papp J (2007) Double-balloon enteroscopy for the diagnosis and treatment of obscure bleeding, inflammatory bowel diseases and polyposis syndromes: we see more but do we know more? Z Gastroenterol 5(45) IF: 1,026

Fuszek P, **Horváth H**, Papp J, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Lakatos P. (2005) No change in location of colorectal cancer between 1993 and 2004 in Hungarian patients. Gut, 54 (Suppl VII.) A 138
IF: 7,692

Horváth HC, Lakatos L, Fuszek P, Lukovich P, Kupcsulik P, Halász J, Schaff Z, Papp J, Lakatos PL (2005): Prevalence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastrooesophageal junction between 1993-2003. *Z Gastroenterol*, 5(43) IF: 0,800

Fuszek P, **Horváth HC**, Papp J, Halasz J, Jaray B, Szekely E, Schaff Z, Papp A, Bursics A, Harsanyi L, Lukovich P, Kupcsulik P, Lakatos P. (2005) No change in location of colorectal cancer between 1993-2004 in Hungarian patients. *Z Gastroenterol*, 5 (43) IF: 0,800

Barna I, **Horvath HC**. (2003) A pulzusnyomás, a diurnális vérnyomásváltozás és a dehidroepiandroszteron-szulfát vizsgálata diabetessel társult hypertóniában. *Hypertonia és Nephrologia*, 18 (Suppl. 4):42

Barna I, **Horvath HC**. (2002) Pulse pressure in patients with renal hypertension. *Nephr Dial and Transpl*, 17 (Suppl. 1): 86-87. IF: 2,570

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm **Prof. Dr. de Chatel Rudolf**, **Prof. Dr. Farsang Csaba** és **Prof. Dr. Szathmári Miklós** tanár uraknak, hogy az általuk vezetett klinikán dolgozhattam és dolgozhatok jelenleg is. **Prof. Dr. Szathmári Miklós** tanár úrnak külön köszönöm, hogy lehetővé tette számomra a PhD munka jelentős részének külföldön történő elvégzését. Jól esett és erőt adott, hogy munkám során mindvégig támogatásáról biztosított.

Köszönöm **Prof. Dr. Papp János** egyetemi tanár úrnak, hogy az általa vezetett munkacsoportban dolgozhatok. Az endoszkópos gyakorlat elsajátításában nyújtott segítsége mellett köszönöm neki, hogy házi opponensként a PhD dolgozatom alapos áttekintésével és hasznos módosítási javaslataival a fokozatszerzés során is támogatott.

Témavezetőmnek, **dr. Speer Gábornak** köszönöm, hogy PhD-hallgatója lehettem. A kutatási téma átengedésével, ötleteivel, az azok megvalósításához szükséges útmutatásaival és a munka szervezésével mindvégig mellettem állt. Külön köszönöm barátságát. **Prof. Dr. Lakatos Péternek** a munkám végzéséhez szükséges laboratóriumi háttérrel és gyakorlati támogatást köszönöm. Az általa vezetett kutatólaborban **dr. Kósa János** segítsége nélkül nem történhetek volna meg a PCR vizsgálatok. **Dr. Bácsi Krisztiánnak** az eredmények statisztikai elemzésében nyújtott segítségéért vagyok hálás.

Dr. Kállay Enikő docens asszony szakmai útmutatásai és önzetlen támogatása nélkül nem készülhetett volna el PhD dolgozatom. Szakmai elhivatottsága és tudományos alapossága például fog szolgálni további munkám során is. Az általa vezetett bécsi laboratóriumban köszönöm **Dr. Giovanna Bises**, **Dipl. Biol. Thomas Nittke** és **Theresa Manhardt** segítségét, akik megkönnyítették számomra a labormunka sokszor keserves óráit. **Zahra Khabirnak** a hasítási variánsokkal kapcsolatos munkámat megalapozó kísérleteit, **Silke Grubernak** a szekvenálásban nyújtott segítségét köszönöm.

Dr. Borka Katalin egyetemi adjunktusnő segítsége nélkül nem jutottam volna metszetekhez. A minták szövettani értékelésén kívül hálás vagyok neki azért, hogy a munkám során felmerült patológiai kérdések megválaszolásában mindig segítségemre volt.

Köszönöm minden kedves Kollégánom és Kollégám segítségét, akik közvetlen vagy közvetett segítségükkel hozzájárultak a PhD munkám befejezéséhez. Közülük is külön köszönetet szeretnék mondani **Gáspár Szilvia**, **Hegedűs Kálmánné** és **Kecse Éva** endoszkópos asszisztenseknek, akik a gyakran feszített munkamenet ellenére is segítettek a szövettani mintavételekben.

Végtelen hálával tartozom **Szüleimnek**, akik nélkül nem juthattam volna el idáig. Szeretetüket és feltétlen támogatásukat a PhD munka során is mindvégig éreztem.

Nem készülhetett volna el ez a munka **Feleségem, Krisztina és Lányom, Blanka** türelme és támogatása nélkül. Ő biztosította és biztosítja számomra azt a szilárd hátteret és érzelmi stabilitást, mely a PhD dolgozat elkészítéséhez is nélkülözhetetlen volt. Sosem felejttem el ezt neki.