

**HER2, P53, FAS, FASL, COX2, PGE₂S, EGFR EXPRESSZIÓ
EMLÓTUMORBAN ÉS MORFOLÓGIAILAG ÉP
PERITUMORÁLIS SZÖVETMINTÁKBAN: A KOCKÁZAT
POTENCIÁLIS ÚJ BIOMARKEREI**

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Nádasi Edit

Témavezető: Prof. Dr. Ember István

PTE ÁOK

Orvosi Népegészségtani Intézet

Pécs

2005

Összefoglalás

Az emlőrák az nők egyik leggyakoribb tumoros megbetegedése a világ valamennyi részén. A megelőzés kulcsa a korai diagnózis. Vizsgálatok bebizonyították, hogy a HER2 és p53 expresszió alapján az emlőtumor progressziója meghatározható. Továbbá, egy korábbi tanulmányunk szerint a Fas és Fas ligand (FasL) expresszió emlőtumorokban eltér az egészséges szövetekben megfigyelttől, és szignifikánsan befolyásolja a betegség kimenetelét. A COX2 expresszió emlőtumorokban szintén új prognosztikai marker. Munkánkban feltételeztük, hogy ezek a molekuláris markerek a nem neoplasztikus emlőszövet malignus potenciáljának meghatározására is alkalmasak lehetnek.

Specifikus antitestek használatával 44 jóindulatú emlőelváltozásban, valamint 72 emlőtumorban és a tumortól 1, 2 ill. 3 cm távolságra vett autológ peritumorális szövetmintáikban meghatároztuk a HER2, p53, Fas és FasL expressziót. Tíz emlőtumor szöveten és autológ peritumorális mintáikon fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatot is végeztünk annak eldöntésére, hogy a peritumorális mintákban (PTT) immunhisztokémiával észlelt HER2 pozitivitas háttérében HER2 génamplifikáció kimutatható-e. További 186 I-II stádiumú emlőtumor mintában és autológ metasztatikus nyirokcsomókból vett mintákban vizsgáltunk a COX2, hormonreceptorok, p53, Fas és FasL expressziót annak meghatározására, hogy a COX2 önmagában vagy más faktorokkal együtt figyelembe véve ad-e felvilágosítást a kemoterápiában részesült emlőtumoros betegek várható prognózisáról. A funkcionális COX2 eltérés emlőtumor-kialakulásban betöltött szerepének jobb megértése céljából 121 emlőtumorban vizsgáltuk a PGE₂S, 167 emlőtumorban pedig az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) expresszióját is. Elégetlen mennyiségű szövetminta miatt nem került sor valamennyi emlőtumor ilyen irányú vizsgálatára.

Eredményeink arra utalnak, hogy még a citoplazmában észlelt immunhisztokémiai HER2 pozitivitas háttérében is található HER2 génamplifikáció. Továbbá, az emlőtumor mintákban és a tumorhoz legközelebb eső peritumorális mintákban fokozott FasL expresszió volt megfigyelhető, amely a távolabbi PTT-ben már nem volt jelen. Ezért a vizsgált biológiai markerek közül a HER2 és a FasL lehetnek olyan korai emlőtumor-biomarkerek, amelyek vékonytű-aspirációs anyagokon jól vizsgálhatók és potenciálisan alkalmasak emlőtumor szempontjában magas kockázatú egyének azonosítására. Emlőtumorra nézve magas kockázatú, anthracyclin alapú kemoterápiában részesülő betegekben pedig a COX2, PGE₂S, p53, Ki67, HER2, Fas és FasL expresszió együttes értékelése alkalmas lehet a kezelésre adott terápia válasz korai meghatározására.

Bevezetés

Az emlőrák az nők egyik leggyakoribb tumoros megbetegedése a világ valamennyi részén. A megelőzés kulcsa a korai diagnózis. Vizsgálatok bebizonyították, hogy a HER2 és p53 expresszió alapján az emlőtumor progressziója meghatározható. Továbbá, egy korábbi tanulmányunk szerint a Fas és Fas ligand (FasL) expresszió emlőtumorokban eltér az egészséges szövetekben megfigyelttől, és szignifikánsan befolyásolja a betegség kimenetelét. A COX2 expresszió emlőtumorokban szintén új prognosztikai marker. Munkánkban feltételeztük, hogy ezek a molekuláris markerek a nem neoplasztikus emlőszövet malignus potenciáljának meghatározására is alkalmasak lehetnek.

Epidemiológia

Egy, a tumoros mortalitást vizsgáló, világviszonylatban végzett felmérés szerint a kelet Európai férfiak a második helyen állnak a világon (414,2), a magyar (566,6) és cseh (480,5)

férfiak tumoros mortalitása pedig kiemelkedően magas. A kelet-európai nők rákmortalitása alacsonyabb volt, mint a 3 másik vizsgált régió nőlakosaié, bár a férfiakhoz hasonlóan, a magyar (357,2) és cseh (333,6) nők mortalitása is kiemelkedően magasnak bizonyult. Összeségében, a tumoros mortalitás Kelet-Európában volt a legmagasabb, az alacsony túlélési arány és a letális tumorok magasabb incidenciájának kombinációjából adódóan.

Célkitűzések

Mivel az emlőtumor és az egyéb szolid tumorok a sejten létrejött genetikai elváltozások halmozódása következtében alakulnak ki, ezért valószínű, hogy egyes jóindulatú elváltozásokban, emlőtumor prekursorokban és a morfológiailag épek tűnő PTT-ben, a „field effect” hipotézisnek megfelelően, már található olyan molekuláris szintű elváltozások, amelyek a tumorfejlődés korai stádiumát jelzik.

Jelen munka céljai a következők voltak:

1. A HER2, p53, Fas, FasL, hormon receptor, COX2, PGE₂S és EGFR expresszió meghatározása immunhisztokémiával emlő-tumoros és az azt 1cm, 2 cm és 3 cm távolságra körülvevő normál peritumorális szövetmintákban.
2. A HER2 génamplifikáció vizsgálata FISH-sel az immunhisztokémiával HER2 pozitív 1cm-es peritumorális szövetmintákban.
3. A vizsgált markerek 5 éves betegségmentes túlélésre és abszolút túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. Markerkombináció felállítása a pontos prognózis meghatározására.
5. Az emlőrák kiújulását korán jelző markerkombináció felállítása.

Beteganyag és módszerek

Beteganyag

A római Regina Elena Rákkutató Intézetben 44 jóindulatú emlőelváltozással kezelt, valamint 72 emlőtumoros betegek szövetmintáit és a tumortól mért 1, 2 illetve 3 cm távolságban vett peritumorális szövetmintákat vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel és FISH-val.

További 186 antraciklin-alapú adjuváns kemoterápiában részesült emlőtumoros beteg tumoros szövetmintáiban és metasztatikus nyirokcsomóiban vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel a COX2, hormonreceptorok, HER2, p53, Ki67, Fas, FasL, PGE₂S és EGFR expresszióját.

Immunhisztokémia (IHC)

Praffinos blokkokból metszett 5 µm-es mintákon végeztük az immunhisztokémiai reakciót. A deparaffinizált és rehidrált mintákat 2-szer 5 percig 750 W teljesítményen mikrohullámú sütőben pH=6 citrát pufferben előkezeltük, majd 60 percig szobahőn a primer antitesttel inkubáltuk. A reakciót streptavidin-biotin jelölt immunoperoxidáz kittel hívtuk elő (LSAB2 kit, DakoCytomaton, Milan, Italy), kromogén szubsztrátként 3-amino-9-etil-karbazol oldatot használtunk (DakoCytomaton). A metszeteket Mayer-hematoxilinnel háttérfestettük és vizes fedőoldattal fedtük (Glycergel, Dakocytomaton).

A COX2 immunofestés során az antigénfeltárás mikrohullámú sütő (2 ciklus, 750 W, 5 perc citrát pufferben) segítségével történt, majd a metszeteket 60 percig inkubáltuk COX2-

specifikus poliklonális primer antitesttel szobahőn. A reakciót streptavidin-avidin jelölt immunoperoxidáz és kromogén szubsztát rendszerrel tettük mláthatóvá (Histostain-Plus, Broad Spectrum (DAB), 85-9643, ZYMED Laboratories Inc., CA, USA). A 212 mintán elvégzett PGE₂S immunhisztokémiai reakcióhoz PGE₂S-specifikus nyúl poliklonális antitestet, míg a 167 mintán elvégzett EGFR festéshez a kereskedelemben kapható antitestet használtunk. Az EGFR esetében az antigént 37°C-n végzett 10 perces pepszines emésztéssel (Digest-All 3 ready-to-use pepsine solution, 00-3009, ZYMED Laboratories Inc., CA, USA) tártuk fel, egyebekben a reakció megegyezett a COX2 esetében leírtakkal.

A reakciókhoz használt antitestek és munkaoldatként használt hígításaik az 1. táblázatban láthatók. A reakciókat 2 vizsgáló, egymástól függetlenül értékelte.

HER2

A HER2 onkoprotein overexpresszióját 300G9 és CB11 magas affinitású monoklonális antitestekkel (mAb) vizsgáltuk. (BioGenex, Menarini, Olaszország).

Simaizom aktin

A simaizom aktin festést 1A4 monoklonális egér anti-humán antitesttel végeztük (DakoCytomation).

p53

A p53 expresszió vizsgálatához DO7 egér monoklonális antitestet használtunk (DakoCytomation).

Fas

A Fas fehérjét kereskedelmi forgalomban kapható antitesttel vizsgáltuk (Novocastra).

FasL

A FasL expresszió vizsgálatához N-20 monoklonális antitestet használtunk (Novocastra).

ER, Pgr

Az ösztrogén (ER) és progeszteron (PgR) receptorok expresszióját a kereskedelmi forgalomban kapható antitestekkel (ER1D5 és 1A6) vizsgáltuk (Immunotech, UCS, Róma, Olaszország).

Ki67

A daganatok proliferációs aktivitását Mib-1 monoklonális antitesttel vizsgáltuk (DakoCytomation).

COX2

COX2-specifikus poliklonális primer antitestet (125 ng/μl, 160107, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) használtunk a COX2 expresszió meghatározásához.

PGE₂S

PGE₂S-specifikus nyúl poliklonális antitestet (125 ng/μl, 160140, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) használtunk a PGE₂S expressziójának meghatározásához.

EGFR

Az EGFR expressziót kereskedelmi forgalomban kapható egér primer antitesttel (750 ng/μl, 28-0005, ZYMED Laboratories Inc., CA, USA) határoztuk meg.

Antitest	Munkaoldat	Származási hely
HER2 300G9	1:200	BioGenex, Menarini, Italy
HER2 CB11	1:200	BioGenex, Menarini, Italy
Actin 1A4	1:300	DakoCytomaton, Milan, Italy
p53 D07	1:300	DakoCytomaton, Milan, Italy
Fas (CD95)	1:50	Novocastra Laboratories Ltd., Milan, Italy
FasL	1:50	Novocastra Laboratories Ltd., Milan, Italy
ER ER1D5	1:300	Immunotech, UCS, Rome, Italy
PgR 1A6	1:300	Immunotech, UCS, Rome, Italy
Mib-1	1:300	DakoCytomaton, Milan, Italy
COX2	1:200	Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA
PGE ₂ S	1:200	Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA
EGFR	1:200	ZYMED Laboratories Inc., CA, USA

1. Táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálatokra használt antitestek és munkaadataik

FISH

PathVysion HER2 DNA Probe Kit-et (Abbott Diagnostici, Rome, Italy) használtunk a HER2 génamplifikáció vizsgálatához emlőtumor és PTT mintákban.

A metszeteket 100 W-os higanygőz lámpával felszerelt Olympus BX60 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus Italia, Segrati, Italy) vizsgáltuk. Különálló szűrőkkel néztük a HER2 szignálokat (Spectrum Orange), a CEP17 szignálokat (Spectrum Green) és a DAPI háttérfestést. A flouorkróm jeleket külön fotóztuk és számítógép segítségével szerkesztettük egy képbe (Quips Genetic Workstations and Imaging Software - Vysis, Abbott Diagnostici, Rome, Italy). A metszeteket 100-szoros nagyításnál vizsgáltuk.

Statisztikai elemzés

A klinikai és biopatológiai változók közötti kapcsolatot χ^2 -teszt segítségével vizsgáltuk. Valamennyi paramétert dichotómikus vagy kategorikus változóként kezeltük és a Pearson statisztika segítségével írtuk le. A betegségmentes túlélést (DFS) és a teljes túlélést (OS) Kaplan-Meyer módszerrel határoztuk meg. Az alcsoportok közötti különbségek figyelembe vétele log-rank teszt segítségével történt. A szignifikancia-szintet $p < 0.05$ értékkel definiáltuk. A relatív kockázatot és a megbízhatósági tartományt valamennyi változóra nézve a Cox univariáns analízissel határoztuk meg, kontroll csoportként a legmegfelelőbb prognosztikai kategóriát használtuk. A multivariáns Cox analízis szolgált a regresszió meghatározására azon prediktív változókkal, amelyek az univariáns analízisben szignifikáns hatással bírtak a DFS-re és a OS-re. A beválasztási határ és a kizárási határ $p=0,10$ és $p=0,15$ volt. Valamennyi elemzés a BMPD számítógépes program segítségével történt (Chicago, IL, USA).

Eredmények

HER2 expresszió 72 emlőtumor mintában és autológ PTT mintákban

A 72 emlőtumor minta közül 17 (26,3%) volt HER2 pozitív (2+/3+). Tíz PTT mintában, a tumortól mért távolságtól függetlenül, immunhisztokémiai sejtmembrán-pozitivitást figyeltünk meg, elsősorban típusos duktális hipepláziában, atípusos diktális hiperpláziában és florid adenózisban. Ezen PTT mintákban nem találtunk 3+ festődést, míg 9

(12,5%) 1 cm-ről, 6 (9,2%) 2 cm-ről és 5 (11,6%) 3 cm-ről vett mintában találtunk 1+ HER2 festődést.

A HER2 overexpresszió szignifikánsan gyakoribb volt a rosszindulatú emlőtumor mintákban mint a jóindulatú emlőelváltozásokban ($p=0,007$) és az 1, 2 illetve 3 cm-ről vett PTT mintákban ($p=0,01$, $p=0,001$ és $p=0,03$). Nem találtunk különbséget a HER2 expresszióban a immunhisztokémiával vizsgált, különböző távolságokról vett PTT csoportok között ($p=0,49$, $p=0,99$ és $p=0,99$).

p53 expresszió 72 emlőtumor mintában és autológ PTT mintáikban

Harmincnégy emlőtumor minta (47,2%) mutatott p53 pozitivitást, 10% és 90% közötti p53 nukleáris festődéssel. A medián érték 40% volt. A jóindulatú emlőelváltozások között csak 1 esetben találtunk p53 festődést. A PTT minták között p53 pozitivitás szintén ritkán volt látható. Néhy típusos duktális hiperpláziában és 3 florid adenózisban láttunk p53 festődést az epiteliális sejtekben (1-10%).

Gyakoribb volt a p53 expresszió a rosszindulatú dagantokban a jóindulatú elváltozásokhoz képest ($p<0,001$) és a PTT mintákhoz képest ($p<0,0001$). A PTT minták különböző csoportjai között nem volt szignifikáns különbség a p53 expresszióban ($p=0,21$, $p=0,42$ és $p=0,99$).

HER2 génamplifikáció FISH vizsgálattal

A 10 immunhisztokémiailag HER2 pozitív szövetminta közül 5-ben találtunk HER2 génamplifikációt (arány >2). A 10 autológ emlőtumor minta közül 7-ben találtunk HER2 génamplifikációt.

Fas és FasL expresszió 72 emlőtumor mintában és autológ PTT mintáikban

A 44 jóindulatú emlőelváltozás közül 40 (90,9%) mutatott kifejezett homogén Fas festődést, elsősorban a sejtmembránra lokalizáltan, míg a rosszindulatú tumoroknak csak 22%-ában találtunk Fa sexpressziót. Másrészt, a 72 tumorminta értékelésekor csak 41-ben (56,9%) láttunk fas expressziót, amely gyakran heterogén intenzitású volt. Ugyanakkor a FasL ezen minták 45,8%-ában expresszáldott. A Fas-pozitív minták száma szignifikánsan alacsonyabb volt az emlőtumorok között a jóindulatú emlőelváltozásokhoz képest ($p<0,0001$), míg a FasL pozitív tumorok száma szignifikánsan magasabb volt a FasL pozitív jóindulatú emlőelváltozásokénál ($p<0,001$). Mindkét esetben a tumort infiltráló fehérvérsejtek szolgáltak belső kontrollként. Az emlőtumor mintákban a Fas és FasL expresszió fordított kapcsolatban állt egymással ($p<0,0001$), 37,5%-ban Fas+/FasL- és 26,4%-ban Fas-/FasL+ fenotípussal. Kettős pozitivitást (Fas+/FasL+) és kettős negativitást (Fas-/FasL-) 19,4, illetve 16,7%-ban láttunk.

A Fas pozitív minták aránya a 3, különböző távolságokról vett PTT csoportban hasonló volt a jóindulatú emlőelváltozásokéhoz, függetlenül a mintavétel helyének a tumoról mért távolságától (90,9% vs 87,5% 1 cm-nél, 90,8% 2 cm-nél, 90,7% 3 cm-nél). Ezzel ellentétben, a FasL expresszió szignifikánsan magasabb volt az 1cm-ről vett PTT mintákban, mint a jóindulatú emlőelváltozásokban (22,7% $p=0,05$). A FasL pozitív minták száma (41,6%) tehát az 1 cm-es PTT minták között hasonló volt a FasL pozitív emlőtumor mintákéhoz (45,8%) és nem láttunk szignifikáns különbséget az invazív emlőrák és az 1cm-es PTT minták FasL expressziója között ($p=0,73$). A távolabbi PTT minták FasL expressziója hasonló volt a jóindulatú emlőelváltozásokban megfigyeltékhez (22,7% vs 27,7% 2 cm-nél,

23.3% 3 cm-nél) és szignifikánsan különbözött az emlőtumor minták FasL expressziójától ($p=0.04$ 2 cm-nél és $p=0.02$ 3 cm-nél).

COX2 expresszió 186 emlőtumor mintában és autológ áttétes nyirokcsomóikban

A 82 COX2 pozitív primer tumor közül 81 (98.8%) áttétes nyirokcsomói szintén COX2 pozitívak voltak, míg 1 esetben (1.2%) a nyirokcsomókban nem láttunk COX2 expressziót. A 13 COX2 negatív primer tumor közül 9 (69.2%) nyirokcsomóiban láttunk COX2 expressziót, míg 4 esetben (30.8%) az áttétes nyirokcsomók COX2 negatívak voltak. A primer tumorokhoz képest tehát az áttétes nyirokcsomókban gyakoribb volt a COX2 expresszió.

PGE₂S expresszió 121 emlőtumor mintában

A 102 COX2 pozitív minta közül 94-ben (92.2%) találtunk PGE₂S immunoreaktivitást, 8 eset (7.8%) PGE₂S negatív volt. A 19 COX2 negatív primer tumor közül 7 (36.8%) volt PGE₂S pozitív, míg 12-ben (63.2%) PGE₂S expressziót nem láttunk. Áttétes nyirokcsomókból nem állt rendelkezésünkre szövetminta a PGE₂S expresszió immunhistokémiai vizsgálatához.

EGFR expresszió 167 emlőtumor mintában

A 142 COX2 pozitív emlőtumor közül 66 (46.5%) expresszált EGFR-t, 76 minta (53.5%) EGFR negatív volt. A 25 COX2 negatív minta közül 16 (64.0%) volt EGFR pozitív, 9 esetben (36.0%) EGFR expressziót nem találtunk. Áttétes nyirokcsomókból nem állt rendelkezésünkre szövetminta az EGFR expresszió immunhistokémiai vizsgálatához.

Az 5 éves betegségmentes túlélés prediktív faktorai

A tumorméret (OR=2.10, CI=1.25-3.51, $p=0.05$), nyirokcsomó státusz (OR=3.76, CI=2.11-6.69, $p<0.001$), COX2 expresszió (OR=4.39, CI=1.59-12.11, $p=0.004$), PGE₂S pozitivitás (OR=3.36 (CI=1.04-10.85, $p=0.004$), Ki67 expresszió (OR=1.95, CI=1.18-3.24, $p=0.009$), Fas pozitivitás (OR=0.18, CI=0.10-0.31) és FasL expresszió (OR=3.28, CI=1.90-5.66) az 5 éves DFS szignifikáns prediktív faktorainak bizonyultak, míg a DFS és a p53 pozitivitás közötti kapcsolat aszignifikancia határon volt (OR=1.60, CI=0.96-2.65, $p=0.069$): Az ER státusz (OR=1.02, CI=0.62-1.69, $p=0.93$), PgR expresszió (OR=1.06, CI=0.64-1.76, $p=0.83$), és HER2 pozitivitás (OR=1.01, CI=0.59-1.71) nem volt szignifikáns hatással a DFS-re. A mind COX2-t mind p53-t expresszáló (OR=5.20, CI=1.58-17.13, $p=0.007$) valamint a COX2t és PGE₂S-t együttesen expresszáló tumorok esetében (OR=7.96, CI=1.09-57.96, $p=0.04$) a DFS szignifikánsan csökkent.

A tumorméret (OR=2.17, CI=1.18-3.98, $p=0.013$), nyirokcsomó státusz (OR=4.61, CI=2.16-3.83, $p<0.001$), COX2 expresszió (OR=3.50, CI=1.07-11.46, $p=0.039$), Ki67 pozitivitás (OR=5.56, CI=1.71-18.09), Fas expresszió (OR=0.09, CI=0.03-0.29) és FasL expresszió (OR=1.96, CI=1.19-3.32) multivariáns analízisben is a DFS szignifikáns prediktorainak bizonyultak.

Változó	Univariációs analízis		Multivariációs analízis	
	OR (95% CI)	p érték	OR (95% CI)	p érték
Tumorméret (< 2 cm vs. > 2 cm)	2.10 (1.25-3.51)	0.005	2.17 (1.18-3.98)	0.013
Nyirokcsomó státusz (N₀ vs. N₊)	3.76 (2.11-6.69)	<0.001	4.61 (2.16-3.83)	<0.001
Szöveti típus (ductális vs. lobuláris)	0.89 (0.45-1.75)	0.78	0.89 (0.25-3.19)	0.88
COX2 (pozitív vs. negatív)	4.39 (1.59-12.11)	0.004	3.50 (1.07-11.46)	0.039
PGE₂S expresszió (pozitív vs. negatív)	3.36 (1.04-10.85)	0.004	2.96 (0.69-12.7)	0.22
EGFR expresszió (pozitív vs. negatív)	1.44 (0.80-2.59)	0.37	0.84 (0.31-2.32)	0.78
p53 státusz (pozitív vs. negatív)	1.60 (0.96-2.65)	0.069	2.63 (0.90-7.71)	0.14
Ki67 státusz (pozitív vs. negatív)	1.95 (1.18-3.24)	0.009	5.56 (1.71-18.09)	0.019
ER státusz (pozitív vs. negatív)	1.02 (0.62-1.69)	0.93	0.42 (0.09-1.87)	0.34
PgR státusz (pozitív vs. negatív)	1.06 (0.64-1.76)	0.83	3.35 (0.75-15.08)	0.19
HER2/neu expresszió (pozitív vs. negatív)	1.01 (0.59-1.71)	0.96	0.61 (0.20-1.93)	0.48
Fas expresszió (pozitív vs. negatív)	0.18 (0.10-0.31)	<0.001	0.09 (0.03-0.29)	0.001
FasL expresszió (pozitív vs. negatív)	3.28 (1.90-5.66)	<0.001	1.96 (1.19-3.32)	0.01

2. táblázat. DFS-t meghatározó prognosztikai faktorok univariációs és multivariációs elemzése 186 emlőtumoros betegen

A teljes túlélés prediktív faktorai

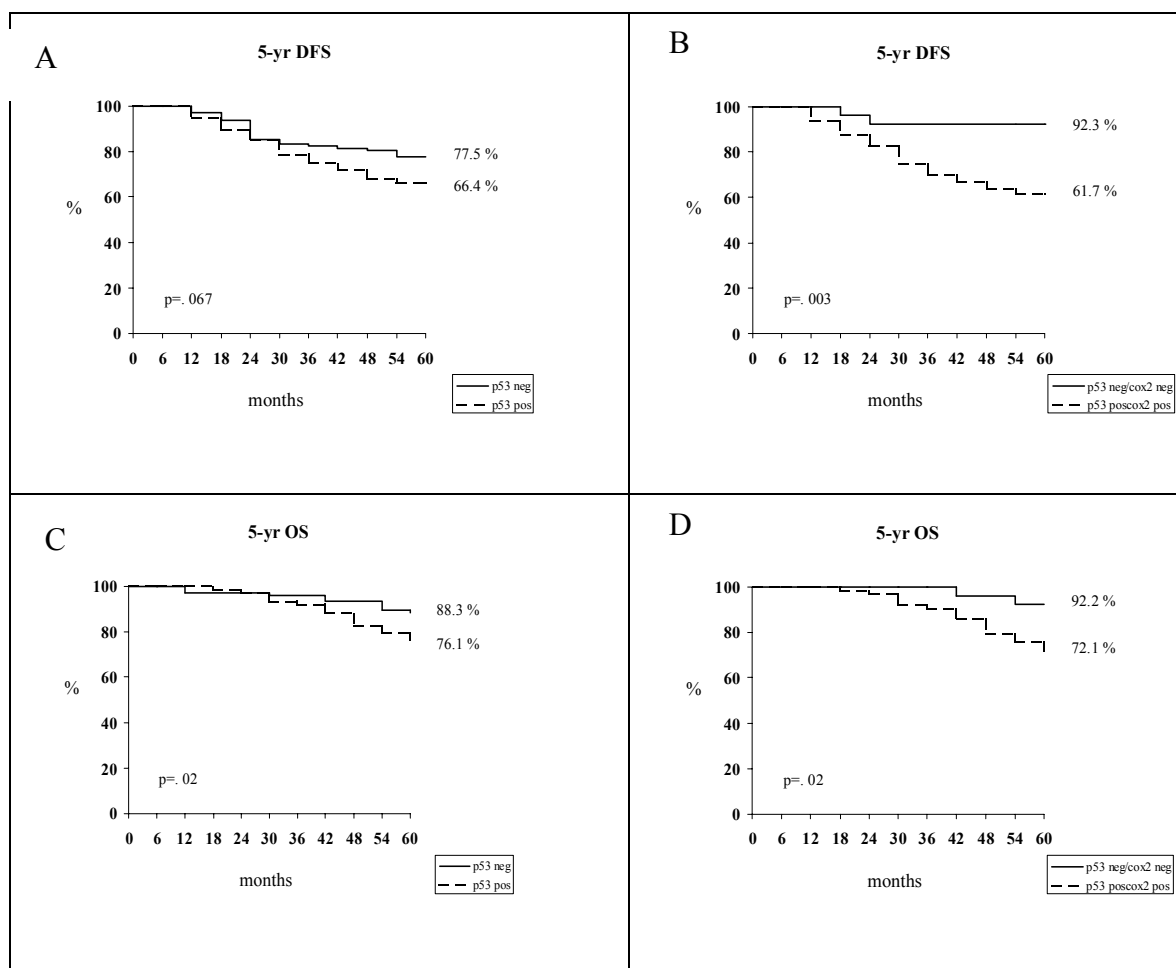
Univariációs elemzésben a tumorméret (OR=2.38, CI=1.20-4.70, p=0.013), nyirokcsomó státusz (OR=3.89, CI=1.77-8.55, p=0.001), p53 pozitívitas (OR=2.17, CI=1.12-4.21, p=0.02), Ki67 pozitívitas (OR=2.43, CI=1.25-4.75, p=0.009), HER2 expresszió (2.68, CI=1.48-4.86), Fas pozitívitas (OR=0.07, 0.03-0.16) és FasL expresszió (OR=6.19, CI=3.05-12.53) szignifikánsan befolyásolta a betegk túlélését, míg a COX2 expresszió és az OS (OR=3.15, CI=0.87-10.27, p=0.05) közötti kapcsolat a szignifikancia-határon volt. A szövettani típus (OR=1.65, CI=0.70-3.89), PGE₂S pozitívitas (OR=2.66, CI=0.63-11.29, p=0.19), EGFR expresszió (OR=1.49, 0.79-2.82), ER státusz (OR=1.39, CI=0.72-2.69, p=0.33) és PgR státusz (OR=1.51, CI=0.79-2.91, p=0.22) nem befolyásolta szignifikánsan a teljes túlélési időt.

A DFS-hez hasonlóan, a COX2 és a p53 együttes expressziója tumorban a OS-t szignifikánsan befolyásolta (OR=4.71, CI=1.10-20.16, p=0.037), míg a DFS-sel ellentétben a COX2-t és PGE₂S-t együttesen expresszáló tumorok esetében nem volt a betegek túlélése rosszabb (OR=3.80, CI=0.51-28.25, p=0.19).

A multivariációs elemzésben a nyirokcsomó státusz (OR=3.66, CI=1.66-8.07, p=0.001), HER2 pozitívitas (OR=4.86, CI=1.12-20.99) és Fas expresszió (OR=0.03, CI=0.005-0.17) szignifikánsan befolyásolta a OS-t, míg a OS és a tumorméret (OR=1.87, CI=0.93-3.79, p=0.081), OS és a p53 pozitívitas (OR=1.89, CI=0.96-3.74, p=0.068), a OS és a Ki67 pozitívitas (OR=1.83, CI=0.91-3.68, p=0.089), valamint a OS és a FasL expresszió (OR=4.29, CI=0.97-18.88) közötti kapcsolat a szignifikanciahatáron volt. A szövettani típus (OR=2.37, CI=0.34-16.96), COX2 expresszió (OR=0.14, CI=0.02-1.26), PGE₂S pozitívitas (OR=1.73, CI=0.18-16.7), EGFR expresszió (OR=0.88, CI=0.20-3.83), ER státusz (OR=0.29, CI=0.05-1.70) és PgR státusz (OR=2.7, CI=0.48-15.4) a túlélést nem befolyásolta.

Változó	Univariációs analízis		Multivariációs analízis	
	OR (95% CI)	p érték	OR (95% CI)	p érték
Tumorméret (< 2 cm vs. > 2 cm)	2.38 (1.20-4.70)	0.013	1.87 (0.93-3.79)	0.081
Nyirokcsomó státusz (N₀ vs. N₊)	3.89 (1.77-8.55)	0.001	3.66 (1.66-8.07)	0.001
Szövettani típus (ductális vs. lobuláris)	1.65 (0.70-3.89)	0.34	2.37 (0.34-16.96)	0.47
COX2 (pozitív vs. negatív)	3.15 (0.87-10.27)	0.050	0.14 (0.02-1.26)	0.15
PGE₂S expresszió (pozitív vs. negatív)	2.66 (0.63-11.29)	0.19	1.73 (0.18-16.7)	0.69
EGFR expresszió (pozitív vs. negatív)	1.49 (0.79-2.82)	0.30	0.88 (0.20-3.83)	0.88
p53 státusz (pozitív vs. negatív)	2.17 (1.12-4.21)	0.02	1.89 (0.96-3.74)	0.068
Ki67 státusz (pozitív vs. negatív)	2.43 (1.25-4.75)	0.009	1.83 (0.91-3.68)	0.089
ER státusz (pozitív vs. negatív)	1.39 (0.72-2.69)	0.33	0.29 (0.05-1.70)	0.25
PgR státusz (pozitív vs. negatív)	1.51 (0.79-2.91)	0.22	2.7 (0.48-15.4)	0.35
HER2/neu expresszió (pozitív vs. negatív)	2.68 (1.48-4.86)	0.007	4.86 (1.12-20.99)	0.08
Fas expresszió (pozitív vs. negatív)	0.07 (0.03-0.16)	<0.001	0.03 (0.005-0.17)	0.002
FasL expresszió (pozitív vs. negatív)	6.19 (3.05-12.53)	<0.001	4.29 (0.97-18.88)	0.109

3. táblázat. OS-t meghatározó prognosztikai faktorok univariációs és multivariációs elemzése 186 emlőtumoros betegen



1. ábra. p53 expresszió hatása DFS-re (A) és OS-re (C); együttes COX2/ p53 expresszió hatása DFS-re (B) és OS-re (D)

Különböző prognosztikai faktorok közötti kapcsolat

A primer tumor COX2 expressziója szignifikáns kapcsolatban állt a p53 expresszióval (OR=2.917, CI=1.308-6.505) és a Ki67 expresszióval (OR=1.993, CI=1.001-3.970). Szignifikáns kapcsolatot találtunk a HER2 és FasL (OR=1.687, CI=1.026-2.774), HER2 és Ki67 (OR=1.765, CI=1.068-2.916), HER2 és EGFR (OR=2.314, CI=1.320-4.056) pozitívítás között. AZ ER expresszió szignifikáns kapcsolatban állt a Ki67 (OR=0.433, CI=0.264-0.710), p53 (OR=0.427, CI=0.258-0.706), PgR (OR=99.171, CI=40.558-242.489) és EGFR (OR=0.448, CI=0.255-0.786) expresszióval, míg a PgR expresszió szignifikáns kapcsolatot mutatott a Ki67 (OR=0.360, CI=0.217-0.596), EGFR (OR=0.377, CI=0.214-0.664) és p53 (OR=0.481, CI=0.292-0.792) expresszióval. A p53 expresszió szignifikáns kapcsolatban állt a FasL (OR=1.843, CI=1.122-3.028) és a Ki67 (OR=2.540, CI=1.524-4.232) expresszióval, valamint szignifikáns kapcsolatot találtunk a Fas és FasL expresszió (OR=0.245, CI=0.146-0.411) között is.

Változó I	Változó II	OR	5% CI	95% CI
FAS	FASL	0.245	0.146	0.411
Ki67	FASL	0.923	0.569	1.498
EGFR	FASL	0.935	0.575	1.730
PGE2S	FASL	1.306	0.595	2.866
COX2	FASL	1.333	0.675	2.633
p53	FASL	1.843	1.122	3.028
HER2	FASL	1.687	1.026	2.774
PgR	FASL	0.966	0.595	1.570
ER	FASL	1.001	0.618	1.622
Ki67	FAS	1.245	0.763	2.031
EGFR	FAS	1.094	0.628	1.904
PGE2S	FAS	0.831	0.378	1.825
COX2	FAS	1.019	0.515	2.014
p53	FAS	0.781	0.476	1.282
HER2	FAS	1.040	0.632	1.713
PgR	FAS	0.818	0.500	1.338
ER	FAS	0.833	0.511	1.358
EGFR	Ki67	1.226	0.703	2.136
PGE2S	Ki67	0.885	0.407	1.928
COX2	Ki67	1.993	1.001	3.970
p53	Ki67	2.540	1.524	4.232
HER2	Ki67	1.765	1.068	2.916
PgR	Ki67	0.360	0.217	0.596
ER	Ki67	0.433	0.264	0.710
PGE2S	EGFR	0.770	0.304	1.948
COX2	EGFR	1.873	0.845	4.155
p53	EGFR	1.435	0.818	2.515
HER2	EGFR	2.314	1.320	4.056
PgR	EGFR	0.377	0.214	0.664
ER	EGFR	0.448	0.255	0.786
COX2	PGE2S	>1.7 x 10 ⁷	>1.7 x 10 ⁷	>1.7 x 10 ⁷
p53	PGE2S	1.714	0.753	3.905
HER2	PGE2S	0.000	0.000	0.000
PgR	PGE2S	1.275	0.586	2.776
ER	PGE2S	0.000	0.000	0.000
HER2	COX2	1.226	0.608	2.471
PgR	COX2	0.919	0.465	1.816
ER	COX2 TU	0.515	0.256	1.036
p53	COX2 TU	2.917	1.308	6.505
HER2	p53	1.417	0.859	2.336
PgR	p53	0.481	0.292	0.792
ER	p53	0.427	0.258	0.706
PgR	HER2	0.697	0.424	1.145
ER	HER2	0.882	0.539	1.444
ER	PgR	99.171	40.558	242.489

4 táblázat. Biopatológiai változók összefüggéseinek vizsgálata OR meghatározásával

Megbeszélés

HER2 expresszió és génamplifikáció

Az általunk vizsgált 72 emlőtumor minta közül 26,3% mutatott HER2 overexpressziót (2+/3+). A jóindulatú emlőelváltozások és a PTT minták kis részében is láttunk változó intenzitású (1+/2+) HER2 pozitivitást, a mintavételnel a tumortól mért távolságtól függetlenül.

A morfológiailag ép PTT mintákban talált HER2 expresszió jelentőségének jobb megértéséhez 10, a tumortól 1, 2 illetve 3 cm-re vett, HER2 pozitív PTT mintában FISH vizsgálattal meghatároztuk a HER2 génamplifikációt. A 10 PTT minta közül 5-ben találtunk HER2 génamplifikációt, a tumortól mért távolságtól függetlenül, míg a vizsgált 10 autológ emlőtumor közül 8 mutatott HER2 génamplifikációt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy még a morfológiailag épnek tűnő emlőszövetben is gyakran áll HER2 génamplifikáció az immunhisztokémiai HER2 pozitívítás háttérében.

p53 expresszió

Ugyan kis számban, de mind a jóindulatú emlőelváltozásokban, mind a PTT mintákban találtunk p53 festődést a sejtmagokban. A pozitívítás nem volt kapcsolatba hozható a primer tumortól való távolsággal, és nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az 1, 2 illetve 3 cm távolságról vett PTT minták p53 expressziójában ($p=0,21$, $p=0,42$ és $p=0,99$). Ezen eredményeknek klinikai jelentőségük lehet, mivel egyes szerzők szerint a jóindulatú emlőelváltozásokban megfigyelt p53 pozitívítás, még ha gyenge és fokális is, statisztikailag szignifikáns módon kapcsolt az emőtumor kialakulásának kockázatához.

Az antraciklin-alapú adjuváns kemoterápiában részesült betegk között a p53 expresszió önmagában szignifikánsan befolyásolta a túlélést (de nem az 5 éves eseménymentes túlélést), míg a tumorban látott egyidejű COX2 és p53 expresszió szignifikánsan befolyásolta mind az 5 éves eseménymentes, mind a teljes túlélést. A klasszikus vélekedés szerint az immunhisztokémiai módszerekkel kimutatott p53 expresszió a TP53 mutáció jelenlétére utal, bár nagyfokú egybeesés a festődés és a mutáció között csak a hosszabb féléletidejű és degradációval szemben ellenálló fehérjét eredményező missense mutációk esetén látható. Adataink arra utalnak, hogy a COX2-t és p53-at overexpresszáló emlőtumorsejtek túlélése ($p=0,003$) és teljes túlélése ($p=0,02$) szignifikánsabban rosszabb, mint a p53- és COX2 negatív tumoroké. Mivel a COX2 génről tudott, hogy indukálni képes a p53 expressziót károsodott sejtekben, és gátolja a vad típusú p53 expresszióját, ezért a tumoros sejtekben közvetlen kapcsolat feltételezhető a károsodott p53 szintje és a COX2 emelkedett expressziója között. Bár nem állt módunkban vizsgálni, hogy a mintáinkban expresszált vad típusú vagy mutáns fehérje, eredményeink arra utalnak, hogy az emlőtumor mintáinkban talált p53 protein legalább részben defektív, mutáns fehérje volt, amely nem volt képes gátolni a COX2 expressziót.

Fas-FasL rendszer

A Fas-FasL interakciók, melyek igen fontosak különböző immunfunkciókban, lényeges szerepet töltenek be a mutációk sejten belüli halmozódását és tumor kialakulását megelőző emlőepithélium-involúcióban. Széles körben simert, hogy a jóindulatú és a rosszindulatú emlőelváltozásokban a Fas és FasL molekulák expressziója eltérő. Más szerzőkkel egyetértésben munkánkban kimutattuk, hogy az emlőtumorsejtekben látott megváltozott Fas-FasL arány összefüggésben áll a kedvezőtlen klinikai kimenetellel. Továbbá, ismereteink szerint ez az első munka, amelyben a Fas és FasL expresszióját emlőtumorsejtekön kívül azok autológ, morfológiailag épnek tűnő peritumorális mintáiban is vizsgálták. A Fas expresszió szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a primer tumorokban,

de homogénean expresszálódott a PTT mintákban, függetlenül a mintavétel helyének a tunortól mért távolságától (87,5%, 90,8% és 90,7%). Ezért a Fa sexpresszió, amely különböző mechanizmusokon (promóter-metiláció, transzkripcionális represszió, hiszton-acetiláció) keresztül inaktiválódhat a primer tumorban, nem tekinthető korai eseménynek az emlőtumork kialakulásának folyamatában.

Bár nem ismerjük az emlőtumorban megfigyelt alacsony Fa sexpresszió hátterében élló okokat, ez a változás mégis az apoptózissal szembeni fokozott rezisztenciát (pl. genetikai elváltozások halmozódása, csökkent NK sejt mediálta immunsurveillance) eredményezhet. A Fas-tól eltérően, a FasL expresszió szignifikánsan emelkedett a rosszindulatú emlődagánatokban (45,5%) és az 1cm-es PTT mintákban (41,7%) a jóindulatú emlőelváltozásokhoz (22,7%) és a távolabbi PTT mintákhoz (27,7% 2 cm-nél és 23,3% 3 cm-nél) képest. A non-limfoid szövetekben megfigyelt Fa sexpressziót több tényező befolyásolja, amelyek között az aktivált limfociták válaszreakcióit részletesen is elemezték. Azonban még nem tisztázott, hogy valóban ez állhat-e a PTT mintákban megfigyelt fokozott FasL expresszió hátterében. Feltételezhető, hogy egyes betegekben a tumorsejt MHC-komplexeit felismerő keringő T sejtek indukálják a fokozott FasL expressziót. Bár a PTT mintákban megfigyelt emelkedett FasL expresszió hátterében a parakrin mechanizmusokat sem zárhatjuk ki, ugyanez az immunmediált reakció az épnek tűnő emlőszövetben sem zárható ki. Bármilyen molekuláris folyamat áll is a fokozott FasL expresszió hátterében, a megfigyelt új fenotípus valószínűleg védelmet biztosít a sejtnak a T sejtek mediálta sejtpusztulással szemben, így elősegítve a jóindulatú emlőelváltozásokban a genetikai változások halmozódását, amelyek később az elváltozás malignus transzformációjához vezethetnek.

COX2 expresszió

A COX2 expresszió jelentős emelkedését (11,4%) figyeltünk meg az áttétekben a primer tumorokhoz képest, valamint szignifikáns kapcsolatot találtunk a COX2 expresszió és a nyirokcsomó státusz között. Ez magyarázható egy egereken kifejlesztett emlőtumor modell adataival, amelyek szerint a homogén *in vitro* COX2 expresszióval ellentétben, csak metasztatizáló sejtvonalak transzplantációjával előidézett tumorokban találtak *in vivo* COX2 expressziót. Ez arra utal, hogy i) *in vivo* a nem metasztatizáló és az áttétet adó tumorokban a COX2 expresszió szabályozása különböző lehet, és hogy ii) a COX2 expresszió előfeltétele lehet a fokozott invazivitást biztosító tumor fenotípus fenntartásának.

COX2 és PGE₂S expresszió

Emlőtumor mintáinkban szignifikáns kapcsolatot figyeltünk meg a COX2 és a PGE₂S expresszió között. Ez nem meglepő, hiszen mások már kimutatták, hogy emlőtumorokban nagy mennyiségben található PGE₂, amelyet a tumort körülvevő emlő fibroblasztok termelnek a gyulladáshoz vezető mediátorok hatására. Az emlőtumor PGE-szintetizáló képessége pedig kapcsolatban áll a tumor COX2expressziójával és metasztatizáló képességével.

A PGE₂S expresszió kapcsolatban állt a minták ER pozitívitasával is. Ez azzal magyarázható, hogy az ösztrogén bioszintézisét katalizáló aromatáz enzimkomplexet 4 transzmembrán receptoron illetve az interleukin-6 indukcióján keresztül a PGE₂ szabályozza. Így biztosítja a hormonfüggő tumor számára életfontosságú ösztrogénszintet.

COX2 és EGFR expresszió

A modelltől eltérően, a COX2 expresszió sem az EGFR, sem a HER2 expresszióval nem mutatott összefüggést. Ennek más szerzők által ajánlott magyarázata a következő leher: i) a tumor szövettani mintái és az *in vitro* modell eltérő környezetet képvisel. Az egyes növekedési faktorok (pl. EGFR) és COX2 endotheliális és stromasejtek által történő szintézise olyan szabályozási kör része lehet, amely nem felel meg a tenyésztett sejtvonalakban talált

biokémiai kapcsolatoknak. ii) Az EGFR expresszió és a kemoterápiára adott kedvezőtlen válasz összefüggését bizonyító tanulmányok az EGFR expresszió meghatározására radioligandos módszereket használtak, míg az ilyen összefüggést nem találó tanulmányokban az EGFR expressziót immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálták. Ez arra utal, hogy a módszertani megközelítés erősen befolyásolja az adott marker prognosztikai értékének vizsgálatát. iii) Az erb-B család tagjain kívül más jelátviteli utak is szerepet játszhatnak a COX2 expresszió szabályozásában. Érdekes itt megjegyeznünk, hogy vastagbélrák sejtekben a HER2/HER3 komplex kialakulásának gátlása nem volt képes teljes mértékben gátolni a COX2 expressziót.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a HER2 pozitív emlőrákok esetében a HER2 pozitivitás hátterében állhat HER2 génamplifikáció, amely nemcsak a tumorban magában, hanem azt a körülvevő, morfológiailag épnek tűnő peritumorális szövetben is okozhat HER2 expressziót. Vizsgálatainkban a PTT minták kis részében p53 nukleáris pozitivitást is találtunk. Sem a HER2, sem a p53 expresszió nem mutatott változást a PTT minták tumortól mért távolságának függvényében, ami arra utal, hogy ez a két molekula a tumoros emlő morfológiailag épnek tűnő szövetében a tartós karcinogén expozícióra már létrejött genetikai változásokat mutatja. Ezzel szemben, a tumortól mért távolság függvényében változást figyeltünk meg a PTT minták FasL expressziójában, mégpedig a tumorközeli PTT mintákban emelkedett fasL expressziót láttunk, amely a távolabbi PTT mintákban már nem volt megtalálható. Ezen adatok alátámasztják azt a feltételezést, hogy a FasL, más biológiai paraméterekkel együtt vizsgálva, új biomarkerként hasznosítható az emlőtumor recidívájára nézve magas kockázatú betegek azonosításában.

Eredményeink alapján emlőtumorra nézve magas kockázatú, anthracyclin alapú kemoterápiában részesülő betegekben a COX2, PGE₂S, p53, Ki67, HER2, Fas és FasL expresszió együttes immunhisztokémiai vizsgálata alkalmas lehet a kezelésre adott terápiás válasz korai meghatározására. Továbbá, a tumorminta mellett a PTT mintában meghatározva FISH analízissel a HER2 gén kópiaszámát, a beteg részére pontosabb prognózis állapítható meg.

Új megállapítások

1. A vizsgált 10, immunhisztokémiaileg HER2 pozitív 1cm-es peritumorális szövetminták közül 5 mutatott FISH vizsgálattal HER2 génamplifikációt, ami alátámasztja azon feltevésünket, hogy a tumor körülvevő, morfológiailag épnek látszó emlőszövet már tartalmazhat a malignus transzformációra hajlamosító molekuláris elváltozásokat
2. A FasL expresszióban fokozatos expressziócsökkenést láttunk a tumortól a mind távolabbi peritumorális minták felé haladva. Az invazív tumorhoz legközelebb lévő 1 cm-es peritumorális szövetmintákban magasabb volt a FasL expresszió ($p=0,05$), a távolabbi peritumorális mintákban azonban ez az overexpresszió szignifikánsan csökkent a tumorhoz képest ($p=0,04$ 2 cm-nél és $p=0,02$ 3 cm-nél). Tehát a FasL expresszió, más biológia markerekkel együtt vizsgálva, hasznos lehet a magas kockázatú betegek kiújuló emlőrákjának korai diagnózisában.
3. A tumorméret, a nyirokcsomó státusz, a COX2, PGE₂S, Ki67, Fas és FasL expresszió szignifikánsan befolyásolta az 5 éves betegségmentes túlélést ($p=0.005$, $p<0.001$, $p=0.004$, $p=0.004$, $p=0.009$, $p<0.001$ és $p<0.001$), míg az abszolút túlélést a tumorméret, a nyirokcsomó státusz, a COX2, p53, Ki67, HER2, Fas és FasL expresszió befolyásolta szignifikánsan ($p=0.013$, $p=0.001$, $p=0.05$, $p=0.02$, $p=0.009$, $p=0.007$, $p<0.001$ és $p<0.001$).

4. A COX2 és p53 együttes expressziója a tumorban szignifikánsan csökkentette mind az 5 éves betegségmentes ($p=0.003$), mint az abszolút túlélést ($p=0.02$).
5. Magas kockázatú emlőtumoros betegekben a COX2, PGE₂S, p53, Ki67, HER2, Fas és FasL expresszió együttes immunhisztokémiai értékelése klinikai jelentőséggel bírhat az antraciklin-alapú adjuváns kemoterápiás kezelésre adott válasz megítélésében.

Köszönetnyilvánítás

Jelen munka a Marie Curie Training Site Fellowship, European Program, HPMT-CT-200-00210 támogatásával készült.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kosztolányi Györgynek és Prof. Dr. Meleghh Bélának segítségükért, amellyel a kutatói pályán elindítottak.

Hálával tartozom Dr. Marcella Mottolesenek (Regina Elena Rákkutató Intézet, Róma) a minták kiváló patológiai klasszifikációjáért és szakmai irányításáért, valamint Dr. Pier Giorgio Natalinak segítségéért és Rómában végzett tevékenységem felügyeletéért.

Hálával tartozom továbbá Prof. Dr. Ember Istvánnak, amiért jelen munka elvégzését lehetővé tette és tudományos munkámat mindenkor támogatta. Köszönöm a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet valamennyi dolgozójának kedvességét, segítőkészségét és támogatását.

Patrizia Scordatinak és Valentina Zerbininek (Regina Elena Rákkutató Intézet, Róma) köszönöm a kiváló technikai asszisztenciát.

Végül, de nem utolsósorban ezúton mondok köszönetet családom tagjainak, akik segítségével, támogatása és megértése nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

Tézisekhez kapcsolódó publikációk:

1. Mottolese M, **Nádasi E**, Botti C, Cianciulli AM, Merola R, Buglioni S, Benevolo M, Giannarelli D, Marandino F, Del Monte G, Ventura I, Natali PG: Phenotypic changes of p53, HER2, and Fas system in multiple normal tissues surrounding breast cancer. *J Cell Physiol* (megjelenés alatt)
2. **Nádasi E**, Sándor J, Mottolese M, Ember I: Prognostic factors in breast cancer patients. *Anticancer Res* (közlésre elfogadva)

Tézisekhez kapcsolódó idézhető absztraktok

1. **Nádasi E**, Sándor J, Mottolese M, Cianciulli AM, Natali PG, Ember I: HER2, p53, Fas, FasL, COX2, PGE₂S, EGFR expression in breast cancer and in normal peritumoral breast tissue: potential novel risk biomarkers. *Anticancer Res* 24(5D):3574, 2004
2. **Nádasi E**, Botti C, Natali PG, Buglioni S, Benevolo M, Ventura I, Del Monte G, Sciarretta F, Giannarelli D, Mottolese M: Immunohistochemical evaluation of HER2, p53, Fas and Fas ligand in breast cancer and multiple adjacent non-neoplastic breast tissues. *Annals Oncol* 13(Suppl 5):35-36, 2002

Tézisekhez kapcsolódó kongresszusi előadások és poszterek

1. **Nádasi E**, Sándor J, Mottolese M, Cianciulli AM, Natali PG, Ember I: HER2, p53, Fas, FasL, COX2, PGE₂S, EGFR expression in breast cancer and in normal peritumoral breast tissue: potential novel risk biomarkers. 7th International Conference of Anticancer Research, Korfu, Görögország, 2004. 10. 25-30.

2. Mottolese M, **Nádasi E**, Botti C, Giannarelli D, Del Monte G, Ventura I, Di Benedetto A, Marandino F, Lopez M, Natali PG: COX-2 expression in primary and metastatic lesions of breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based therapy: prognostic implications. 95th Annual Meeting of AACR, Orlando, Florida, USA, 2004. 03. 27-31.
3. **Nádasi E**, Botti C, Giannarelli D, Di Filippo F, Ventura I, Del Monte G, Scordati P, Natali PG, Mottolese M: Epidemiology of breast cancer: COX2 as a new prognostic factor. 1st Conference of the Hungarian Society of Molecular Predictive Epidemiology, Pécs, 2003. 11. 28-29.
4. Sándor J, **Nádasi E**: Role of interactions between oncogenes and suppressor genes in the pathogenesis of breast cancer. 1st Conference of the Hungarian Society of Molecular Predictive Epidemiology, Pécs, 2003. 11. 28-29
5. **Nádasi E**, Mottolese M, Natali PG, Varjas T, Ember I: COX2 expresszió antraciklin adjuváns kemoterápiában részesült, magas kockázatú emlő tumoros betegekben. NETT XIV: Nagygyűlése, Hévíz, 2003. 04. 24-25.
6. Mottolese M, **Nádasi E**, Buglioni S, Benevolo M, Cianciulli AM, Merola R, Ventura I, Del Monte G, Giannarelli D, Botti C, Natali PG: HER2 expression and/or gene amplification, p53 nuclear accumulation, Fas-ligand upregulation in breast cancer and autologous peritumoral tissues: diagnostic implications. 94th Annual Meeting of AACR, Toronto, Kanada, 2003. 04. 05-09.
7. **Nádasi E**, Botti C, Giannarelli D, Di Filippo F, Del Monte G, Ventura I, Scordati P, Natali PG, Mottolese M: COX2 expression in high risk breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based therapy. „From Molecular Oncology to Molecular Therapy” 29th Simposion of the Italian Society of Cancerology, Genova, Olaszország, 2002. 10. 27-30.
8. **Nádasi E**, Botti C, Natali PG, Buglioni S, Benevolo M, Ventura I, Del Monte G, Sciarretta F, Giannarelli D, Mottolese M: Immunohistochemical evaluation of HER2, p53, Fas and Fas ligand in breast cancer and multiple adjacent non-neoplastic breast tissues, 27th ESMO Congress, Nizza, Franciaország, 2002. 10. 18-22.

Tézisekhez nem kapcsolódó publikációk:

1. Németh Á, **Nádasi E**, Beró A, Olasz L, Nyárádi Z, Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Csejtei A, Faluhelyi Z, Ember I: Early effects of Transplatin on oncogene activation *in vivo*. *Anticancer Res* 24:3997-4002, 2004
2. **Nádasi E**, Bene J, Havasi V, Komlósi K, Talián G, Melegh G, Papp E, Gasztonyi B, Szolnoki Z, Sándor J, Mózsik G, Tóth K, Melegh B, Wittmann I: Detection of Leu40Arg variant of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in subjects with thrombotic diseases. *Thromb Res* (megjelenés alatt)
3. **Nádasi E**, Varjas T, Pajor L, Ember I: Carcinogenic potential of trans-2-hexenal is based on epigenetic effect. *In Vivo* (megjelenés alatt)
4. **Nádasi E**, Melegh B, Seress L, Kosztolányi Gy: Mitokondriális DNS⁴⁹⁷⁷ deléció intenzív terápián átesett újszülöttek agymintáiban. *Orv Hetil* 145(25):1321-1325, 2004
5. Németh Á, **Nádasi E**, Gyöngyi Z, Olasz L, Nyárádi Z, Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Kiss I, Ember I: Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. *Anticancer Res* 23(6C):4831-4836, 2003
6. **Nádasi E**, Melegh B, Seress L, Kosztolányi G: Mitochondrial DNA⁴⁹⁷⁷ deletion in brain of newborns died after intensive care. *Acta Biol Hung* 54(3-4):253-262, 2003

7. Bene J, **Nádasi E**, Kosztolányi G, Méhes K, Melegh B: Congenital cataract as first symptom of a neuromuscular disease caused by a novel single large scale mitochondrial DNA deletion. *Eur J Hum Genet* 11(5):375-379, 2003
8. Gyöngyi Z, Grama L, **Nádasi E**, Sándor J, Németh Á, Varga C, Kiss I, Ember I: Flow cytometric analysis of DMBA-induced early in vivo ras expression. *In Vivo* 16(5):323-326, 2002
9. Németh Á, Gyöngyi Z, **Nádasi E**, Ember Á, Olasz I, Nyárádi Z, Skapinyecz J, Ember I: Effect of cisplatin treatment on early activation of oncogenes in vivo. *In Vivo* 16(5):307-310, 2002
10. Gyöngyi Z, **Nádasi E**, Varga C, Kiss I, Ember I: Long term effects of 1-nitropyrene on oncogene and tumor suppressor gene expression. *Anticancer Res* 21(6A):3937-3940, 2001
11. Kovács E, Morava É, **Nádasi E**, Czakó M, Melegh B, Kosztolányi G: Fragilis X szindróma szűrésére alkalmas molekuláris biológiai eljárás. *Orv Hetil* 139(52):3121-3123, 1998
12. Varjas T, **Nádasi E**, Kovács E, Molnár J, Melegh B, Kosztolányi G: Prader-Willi szindróma diagnózisa citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekkel. *Orv Hetil* 139(28):1685-1687, 1998
13. Molnár J, Kis A, Melegh B, **Nádasi E**, Varjas T, Kovács E, Kosztolányi G: Mutációanalízis a CTG-bázishármas megsokszorozódásának vizsgálatával egy három-generációs myotonia dystrophicás családban. *Orv Hetil* 139(18):1083-1085, 1998

Tézisekhez nem kapcsolódó idézhető absztraktok

1. Kosztolányi G, **Nádasi E**, Melegh B, Morava É Czakó M: Mitochondrial DNA⁴⁹⁷⁷ deletion in human newborn samples. *Eur J Hum Genet*, 7:P894, A143, 1999
2. Ember I, Varga C, Pajor L, **Nádasi E**, Varjas T, Nowrasteh G, Csejtey A, Bujdosó L, Rodler I, Kvarda A: Trans-hexenal, a new naturally occurring carcinogen. *Anticancer Res* 24(5D):3479, 2004
3. Varjas T, Nowrasteh G, **Nádasi E**, Virág V, Simon A, Gunszt B, Ember I: The early effect of plant extracts on tumor growth due to carcinogen exposure. *Anticancer Res* 24(5D):3664, 2004

Tézisekhez nem kongresszusi kapcsolódó előadások és poszterek

1. **Nádasi E**, Rozmer Z, Bozak ER, Hicks JR, Perjési P: A synthetic curcimine analogue: chemopreventive or genotoxic effect? 2nd International Conference of the Hungarian Society of Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. 04. 01-02.
2. Bognár E, **Nádasi E**, Dombi Zs, Végh G, Stánitz É, Fehér K, Szepes É, Farkas B, Ember I: A bőrrák megelőzési lehetőségei magyar iskoláskorú populációban: nyugat-magyarországi vizsgálatok. 2nd International Conference of the Hungarian Society of Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. 04. 01-02.
3. Virág V, **Nádasi E**, Varjas T, Gyöngyi Z, Somlyai G, Ember I: The Possible Role of Natural Products in the Dietotherapy of Cancer-Related Weight Loss: an Animal Model. 2nd International Conference of the Hungarian Society of Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. 04. 01-02.
4. Nowrasteh G, Varjas T, **Nádasi E**, Orsós Zs, Kiss I, Ember I: Polymorphism modulates cancer sensitivity to chemotherapeutic drugs. 2nd International Conference of the Hungarian Society of Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. 04. 01-02.
5. Németh Á, **Nádasi E**, Gyöngyi Z, Olasz L, Nyárádi Z, Ember Á, Kvarda A, Bujdosó L, Arany I, Kiss I, Ember I: Early effects of Different cytostatic Protocols for Head and Neck Cancers on Oncogene Activation in Animal Experiments. 2nd International

- Conference of the Hungarian Society of Molecular and Predictive Epidemiology, Pécs, 2005. 04. 01-02.
6. Ember I, Varga C, Pajor L, **Nádasi E**, Varjas T, Nowrasteh G, Csejtey A, Bujdosó L, Rodler I, Kvarda A: Trans-hexenal, a new naturally occurring carcinogen. 7th International Conference of Anticancer Research, Korfu, Görögország, 2004. 10 25-30.
 7. Varjas T, Nowrasteh G, **Nádasi E**, Virág V, Simon A, Gunszt B, Ember I: The early effect of plant extracts on tumor growth due to carcinogen exposure. 7th International Conference of Anticancer Research, Korfu, Görögország, 2004. 10 25-30.
 8. **Nádasi E**, Gyűrűs P, Kosztolányi S, Bene J, Fazekas S, Dömösi P, Torroni A, Melegh B: Kevert magyar populációban talált mtDNS haplocsoportok. Magyarország és a Kelet – őstörténeti konferencia, Budapest, 2004. 06. 02-04.
 9. **Nádasi E**, Varjas T, Pajor L, Ember I: 2-hexenal: egy epigenetikus hatású növényi karcinogén. NETT XV. Nagygyűlése, Szekszárd, Hungary, May 6-8, 2004
 10. Ember I, Kiss I, Sándor J, **Nádasi E**, Varjas T, Gyöngyi Z, Nowrasteh G, Varga C: Present and future of the molecular epidemiology."Globalization and health in Europe: harmonising public health practice" EUPHA Conference 2003", Róma, Olaszország, 2003. 11. 20-22.
 11. **Nádasi E**: A genetikailag módosított élelmiszerekről. „Egészség a fogyatékosok évében” rendezvénysorozat, Szombathely, October 15, 2003. 10. 15.
 12. Nowrasteh G, Mottolése M, **Nádasi E**, Varjas T, Ember I: Új technika tumoros szövettani minták vizsgálatában: a kromogén in situ hibridizáció. NETT XIV. Nagygyűlése, Hévíz, 2003. 04 24-25.
 13. **Nádasi E**, Varjas T, Ember I: Investigation of the anticarcinogenic effect of resveratrol in a mouse gene expression model. New Anticancer Agents, International Conference Organized and Supported by the International Institute of Anticancer Research, Athén, Görögország, Greece, 2001. 06. 08-12.
 14. Varjas T, **Nádasi E**, Pusztai Z, Ember I, Gyöngyi Z, Durnev A, Kiss I: Anticarcinogenic effect of bemetil (an antioxidant compound) in a gene expression model., New Anticancer Agents, International Conference Organized and Supported by the International Institute of Anticancer Research, Athén, Görögország, Greece, 2001. 06. 08-12.
 15. Varjas T, **Nádasi E**: Role of 2-hexenal, a plant aldehyde in carcinogenesis. Fiatal Onkológusok Fóruma, Pécs, 2001. 05. 09-11.
 16. **Nádasi E**: Környezeti tényezők szerepe az öröklődő betegségek kialakulásában. Mandulavirágzás Tudományos Napok, PTE, Pécs, 2001. 03. 05-07.
 17. Ember I, Kiss I, Gyöngyi Z, Varga C, Perjési P, **Nádasi E**: In vivo oncogene expression could be induced with chemical carcinogenes in inbred, sensitive mice and could be used as an early potential biomarker. Mouse Models of Cancer, An AACR Special Conference in Cancer Research, San Diego, California, USA, 2000. 11. 29-12. 03.
 18. Tóth G, **Nádasi E**, Morava É, Farkas V, Kosztolányi G, Melegh B: Mitokondriális DNS-deléció egy MELAS-szindrómás betegben. Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa Pécs, 1999 08. 25-28.
 19. Kosztolányi S, **Nádasi E**, Gyűrűs P, Melegh B, Kosztolányi G: Mitokondriális DNS-polimorfizmusok magyar populációmintában. Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa Pécs, 1999 08. 25-28.
 20. **Nádasi E**, Morava É, Czákó M, Melegh B, Kosztolányi G: Somatic mutations in cadaver brain samples. Congress of the European Society of Human Genetics, Genf, Svájc, 1999. 05. 29-06. 01.
 21. **Nádasi E**, Tárnok A, Varjas T, Melegh B, Kosztolányi G: Familiális t(5;18)(q33;q23) kimutatása fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) technikával. Magyar

- Gyermekgyógyász Társaság 1998. évi Nagygyűlése, Szeged, 1998. 06. 25-27.
22. **Nádasi E**, Melegh B, Kosztolányi G: Somatic mutations in cadaver brain samples., 14th International Medical Sciences Student Congress, Istanbul, Turkey, 1998. 05. 05-09.
 23. Kosztolányi R, **Nádasi E**, Horváth G, Kosztolányi G, Farkas B: Rothmund-Thomson szindróma testvérpárnál. Magyar Dermatológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 1997. 12. 05-06.
 24. **Nádasi E**, Varjas T, Kovács E, Molnár J, Melegh B, Kosztolányi G: Szomatikus mutációk vizsgálata kadáver agymintákon. Magyar Gyermekgyógyász Társaság 1997. évi Nagygyűlése, Szombathely, 1997. 06. 19-21. (különdíjat nyert)
 25. Molnár J, Melegh B, Kis A, **Nádasi E**, Varjas T, Kovács E, Kosztolányi G: Molekuláris genetikai vizsgálatok a dystrophia myotonica diagnosztikájában. Magyar Gyermekgyógyász Társaság 1997. évi Nagygyűlése, Szombathely, 1997. 06. 19-21. (díjat nyert)
 26. Varjas T, **Nádasi E**, Kovács E, Molnár J, Kis A, Melegh B, Kosztolányi G: Prader-Willi szindróma diagnózisa citogenetikai és molekuláris genetikai módszerekkel. Magyar Gyermekgyógyász Társaság 1997. évi Nagygyűlése, Szombathely, 1997. 06. 19-21. (díjat nyert)
 27. Kovács E, **Nádasi E**, Varjas T, Molnár J, Melegh B, Kosztolányi G: Fragilis X szindróma szűrésére alkalmas molekuláris biológiai eljárás. Magyar Gyermekgyógyász Társaság 1997. évi Nagygyűlése, Szombathely, 1997. 06. 19-21. (díjat nyert)
 28. Molnár J, Kis A, **Nádasi E**, Melegh B, Kosztolányi G: -triplet expanszió vizsgálata egy háromgenerációs myotonia dystrophicás családban. Magyar Neurogenetikai Társaság Kongresszusa, Szombathely, 1997. 05. 09-10
 29. **Nádasi E**: Mitokondriális betegségek]. Veszprémi Akadémiai Bizottság gyűlése, Győr 1997. 04. 17.
 30. **Nádasi E**, Varjas T, Molnár J, Melegh B, Kosztolányi G: Szomatikus mutációk vizsgálata kadáver agymintákban. Magyar Neurogenetikai Társaság Kongresszusa, Szombathely, 1997. 05. 09-10.
 31. **Nádasi E**, Seress L, Tornóczky T, Kosztolányi G: Triszómiás csecsemők hippocampusának neuropatológiai vizsgálata. Gyermekgyógyász Társaság 1996. évi Nagygyűlése, Budapest
 32. Melegh B, Bock I, **Nádasi E**, Kosztolányi G, Méhes K: Multiplex mitokondriális DNS-deléció egy Brachmann-De Lange fenotípusú gyermekben]. Gyermekgyógyász Társaság 1996. évi Nagygyűlése, Budapest
 33. **Nádasi E**: London Dysmorphology Database használatáról előadás a POTE Gyermekklinikán megrendezett gyermekgyógyász-továbbképzésen, Pécs, 1996. 04. 12.
 34. **Nádasi E**, Bock I, Melegh B, Gáti I, Méhes K: Multiplex mitokondriális DNS-deléció és perzisztáló hipertermia egy Brachmann-De Lange fenotípusú betegben. Fiatal Magyar Kutató Gyermekgyógyászok II. Kongresszusa, Szeged, 1996. 03. 22-23.

Tézisekhez kapcsolódó közlemények impakt faktora: 6,81

Kumulatív impakt faktor: 19,591

In extenso közlemények száma: 15

Összes idézettség: 3