

**Molekuláris biomarkerek vizsgálata oro-faringeális  
daganatokban. Állatkísérletes és humán molekuláris  
epidemiológiai vizsgálatok**

**Phd értekezés**

**Dr. Németh Árpád**

**Témavezető: Prof. Dr. Ember István**

**PTE ÁOK**

**Orvosi Népegészségtani Intézet**

**Pécs  
2006**

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Témafelvetés	8
2/a. A fej-nyaki daganatok etiológiája, főbb rizikótényezők, a tumorgenezis molekuláris biológiája	9
2/b. A biomarkerek és vizsgálómódszereik	13
2/c. Az oro-faringeális karcinogenezis során kialakuló génszintű elváltozások	15
2/d. Népegészségügyi, prevenciós és klinikai szempontok	21
3. Célkitűzések	24
4. Anyag és módszer	25
4/a. Állatkísérletes modell vizsgálatok I.-III.	26
4/b. Humán vizsgálatok I.	28
4/c. Humán vizsgálatok II.	28
5. Eredmények	29
5/a. <i>Cisplatin-5Fluorouracil és Bleomycin-Vincristin-Metotrexát (BVM)</i> kemoterápiás protokollok összehasonlító vizsgálata állatkísérletben	29
5/b. A <i>Cisplatin</i> génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata az ismert mutagenitás tükrében	31
5/c. A <i>Transplatin</i> génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata	33
5/d. Humán vizsgálatok kezelt és kezeletlen tumoros betegeken	35
5/e. Génexpresszió vizsgálata perifériás fehérvérsejtekből. Új biomarker vizsgálata perifériás vérből a veszélyeztettség megállapítására	36
6. Megbeszélés	37
7. Összefoglalás	43
8. Új tudományos megállapítások a dolgozatban	44
9. Felhasznált irodalom	45
10. Saját közlemények	50
12. Köszönetnyilvánítás	57

## Rövidítések

1. RNS	Ribonukleinsav
2. mRNS	Messenger RNS
3. DNS	Dezoxiribonukleinsav
4. BNO	Betegségek Nemzetközi Osztályozása
5. PCR	Polimerase Chain Reaction
6. TNM	Tumoros Megbetegedések Klinikai Stádiumbeosztása
7. HPV	Humán Papilloma Vírus
8. HSV	Herpes Simplex Vírus
9. HIV	Humán Immundeficiencia Vírus
10. DMBA	Dimetilbenzantracén
11. EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
12. FGF	Fibroblaszt Növekedési Faktor
13. MMR	Mismatch Repair Gén
14. BVM	Bleomycin-Vincristin-Metotrexát Séma
15. BVMM	Bleomycin-Vincristin-Metotrexát-Mitolactol Séma
16. BVMC	Bleomycin-Vincristin-Metotrexát-Cisplatin Séma
17. TNF	Tumor Nekrózis Faktor
18. CFu	Cisplatin-5-Fluoro-Uracil Séma
17. DEPC	Dietil-pirokarbonát
18. SSC(1X) oldat	0,15 M NaCl + 0,015 M nátrium-citrát
19. Prex.	Próbaexcízió
20. i.p.	Intraperitoneális adagolás

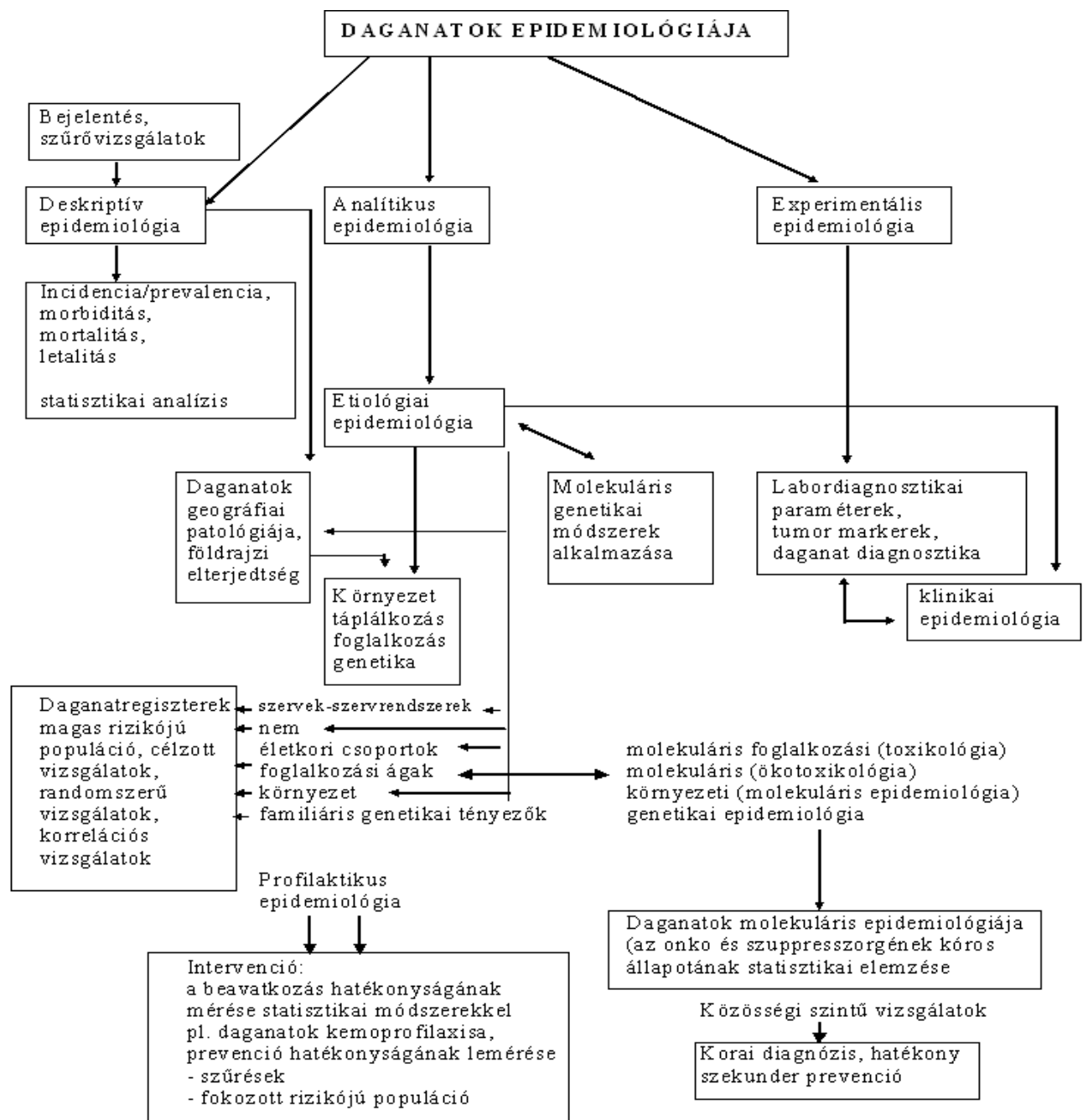
# 1. Bevezetés

A molekuláris epidemiológia kifejezést a múlt század utolsó két évtizede óta használjuk. A csúcstechnológia (molekuláris genetikai módszerek) egyszerűbbé és olcsóbbá válása eredményezte, hogy a szervezetben zajló folyamatok megismerése molekuláris szinten vált elérhetővé, így a molekuláris vizsgálatok az epidemiológia részévé váltak. A molekuláris és prediktív epidemiológia jelenleg az epidemiológia egy részterülete, definícióját röviden úgy fogalmazhatjuk meg, mint molekuláris biológiai módszerek alkalmazását az epidemiológiában (1). A hagyományos és molekuláris epidemiológia közötti fő különbség a molekuláris szintű biomarkerek használata. A biomarkerek alkalmasak lehetnek többek között az expozíció idejének és megtörténtének meghatározására, a korai biológiai elváltozások azonosítására, a rizikó csoportok kijelölésére, a prevenció és a terápia hatékonyságának mérésére is.

A molekuláris szintű biomarkerek egyik fontos ismérve, hogy már korán, premorbid stádiumban pozitívak lehetnek, amikor makro- és mikromorfológiailag, azaz fenotípusosan és szimptomatikusan még nem alakult ki semmiféle eltérés. Éppen ezért ezek a markerek, a primer és a szekunder prevenció határán mozogva, a primer prevenció eszköztárába is tartoznak, tehát nemcsak a mortalitást csökkentik, mint a szekunder prevenció markerek, hanem a morbiditást is. Ezek a markerek alkalmasak egyes prevenció módszerek (pl. kemoprevenció) hatásosságának detektálására, ezért ezeket intervenció molekuláris epidemiológiai markereknek is nevezzük. Nem tesznek lehetővé korai diagnózist, ebben a fenotípusosan „negatív”, de genotípusosan „pozitív” folyamatban, hanem a kockázatbecslés, kockázatazonosítás és kockázatkezelés eszközei (1. ábra).

Azokat a biomarkereket, melyeket molekuláris és prediktív epidemiológiai módszerekkel vizsgálunk, molekuláris és prediktív epidemiológiai biomarkereknek nevezzük. Amennyiben korai stádiumban történik használatuk, korai biomarkereknek hívjuk őket. A korai, behatároló markerek, elsősorban az expozíciót jelzik, míg a karcinogenezis során később vizsgált markerek a korai biológiai hatás vizsgálatának eszközei (2,3).

Az általunk használt markertípus a *génexpresszió-változás* mérése volt, melyet a 2. ábrán láthatóan, a korai biológiai hatás markereként alkalmaztunk. A környezeti kémiai karcinogenezis során a karcinogén anyag felismerése, a hatás igen korai és pontos detektálása fontos tényező a daganatok megelőzésében (3,4,5). Ha időben tudjuk kimutatni ezen anyagok hatását, az exponáltak kiemelhetők, kezelhetők, a prevenció stratégiák alkalmazhatók.



1. ábra. Daganatok epidemiológiája (Ember 1996)

# MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIA

## AZ EXPOZÍCIÓ MARKEREI

A VEGYÜLET  
KÖRNYEZETI  
KONCENTRÁ-  
CIÓJA

A VEGYÜLET  
VAGY META-  
BOLITJAI A  
SZERVEZET-  
BEN

DNS- ILL.  
FEHÉRJE-  
ADDUKTOK

## A HATÁS MARKEREI

KROMOSZÓMA-  
ABERRÁCIÓK,  
SCE, MUTÁCIÓK  
ONKOGÉN-  
AKTIVÁCIÓ

PL. ABNORMÁLIS  
KÖPET- VAGY -  
CERVIX CITOLÓGIA

## A BETEGSÉGET JELZŐ MARKEREK

KLASSZIKUS  
TUMOR  
MARKEREK  
PL. CEA, PSA

PL. METASZTÁZIS-  
SPECIFIKUS  
ONKOGÉNEK  
AKTIVÁCIÓJA

EXPOZÍCIÓ → BELSŐ → BIOLÓGIAILAG → KORAI → MEGVÁLTOZOTT → BETEGSÉG → SZÖVŐDMÉNYEK,  
DÓZIS → HATÁSOS → HATÁS → BIOLÓGIAI → STRUKTÚRA/ → PROGNÓZIS  
DÓZIS HATÁS HATÁS FUNKCIÓ

## AZ EGYÉNI ÉRZÉKENYSÉG MARKEREI

GENETIKUS/METABOLIKUS (P450, GST), DNS-REPAIR, TÁPLÁLTSÁGI- és IMMUNOLÓGIAI STÁTUSZ

## 2. ábra. Daganatok molekuláris epidemiológiája (Kiss, Ember 2005)

Mivel a daganatkialakulás szükségszerűen onko- és szuppresszor génkaszkádot involvál, célszerűnek tűnt a folyamatban résztvevő gének vizsgálata. Az általunk kiválasztott három gén, a *c-myc*, a *Ha-ras* és a *p53*, kulcsgén a fej-nyaki laphám eredetű daganatok kialakulásában és a korai karcinogén hatást jelezhetik biomarkerként. Az onkogének közül a *Ha-ras* az iniciációban, a *c-myc* az immortalizációban és a progresszióban, a *p53* szuppresszorgén pedig a DNS reparációban játszik szerepet. A *p53*-expresszió emelkedése és csökkenése is fontos jel lehet hiszen nemcsak a fenti szerepe van a *p53*-nak, hanem anti-apoptotikus hatása is ismert (6-18).

Sokféle változás lehet génszinten a karcinogén hatás után, így pontmutáció, kromoszóma rendellenességek, génamplifikáció stb. Mi a hagyományos mutagenetikai vizsgálatokkal szemben génexpresszió változásokat kívántuk vizsgálni. Ezek a változások a karcinogenezis korai szakaszában jelennek meg, a többlépcsős karcinogenezis folyamatában. Intézetünkben a kvantitatív PCR vizsgálatokat alkalmazzuk a génexpresszió változások vizsgálatára így több ezer gén vizsgálata helyett kisebb számú, kulcsgén vizsgálatát tartjuk indokoltnak. Annak ellenére, hogy kevésbé specifikus, mint egyes mutagenetikai vizsgálatok, „többet” ad, mert nemcsak a genetikai, hanem az epigenetikus eltérések is vizsgálhatók.

Korábban állatkísérletes modellt alakítottunk ki kémiai karcinogenezis iránt érzékeny egértörzs (CBA/Ca,H-2<sup>k</sup>) egyedeit használva. Kiválasztottunk három onko/szuppresszor gént

(*p53*, *Ha-ras*, *c-myc*), így vizsgáltuk meg a korai hatásokat (24, 48, 72 óra után), az alkalmazhatóságot és a későbbi humán adaptáció lehetőségét (19). A karcinogén kezelést (citosztatikumok és az azokból álló protokollok) cervikális diszlokáció követte, a vizsgálandó szerveket eltávolítottuk, majd RNS-t izoláltunk belőlük, és a mintát kemilumineszcensen jelölt génpróbákkal hibridizáltuk. Vizsgáltuk a génexpresszió változások mértékét és időbeli változásait. A génexpresszió változásokat kezdetben csak a korai elváltozások markereként alkalmaztuk, de később hosszútávú kísérletet is végeztünk, ahol a génexpresszió változásokat a karcinogén-kezeléstől fogva 18 hónapig követtük nyomon. Kísérleteink végső célja az volt, hogy megpróbáljuk megítélni, használható-e az onko/szuppresszor gének expressziójának vizsgálata egyes citosztatikumokkal kiváltott karcinogén hatások jelzésére, követésére.

Az állatkísérletek biztató eredményei után humán vizsgálatokat végeztünk, ahol kezeletlen és kezelt tumoros betegek szövetmintáiból és a perifériás vérből határoztunk meg génexpresszió változásokat. Célunk annak vizsgálata volt, hogy a klinikai gyakorlatban használt platina készítmények hozzájárulhatnak-e a magasabb recidíva számhoz, az esetlegesen kialakuló második primer és a szekunder tumorok kialakulásához; a kezeletlen tumorszöveti génexpresszió hogyan viszonyul a kemoterápia és a besugárzás utáni állapotokhoz, miután a *Cisplatin* ismert IARC 2/A osztályú karcinogén.

## 2. Témafelvetés

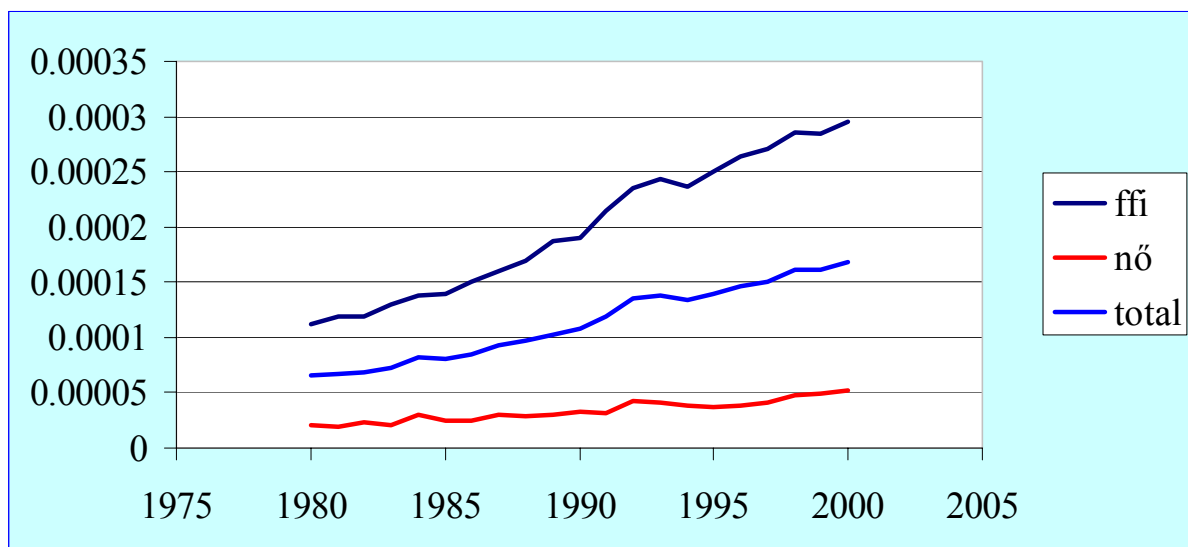
A szájüregi rák pontos meghatározása a szakirodalomban is vitatott. Szájüregi rákon a betegségek nemzetközi osztályozása (BNO) szerint az ajak, a szájüreg és a garat C00-C14 (C01-06, C10-14 / Döbrössy 2001) (64) kódszámokkal megjelölt (rosszindulatú) daganatait értjük. Nem sorolják a oro-faringeális daganatok közé a tonsillák (C09), gége (C32), orrüreg (C30), sinusok (C31), valamint a nyálmirigyek (C07- C08) daganatait, amelyek a száj-garatüregi (oro-faringeális) daganatokkal együtt a fej-nyaki daganatok csoportját alkotják melynek 92%-a oro-faringeális rák (64). Jelen dolgozatban a PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika beteganyagából származó száj-garatüregi laphám karcinómák eseteivel foglalkozunk humán vizsgálataink során (humán vizsgálatok I.), míg a perifériás vér vizsgálata géneexpresszió vizsgálata a PTE ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fej-nyak Sebészeti Klinika gége karcinóma miatt kezelt beteganyagából származik (humán vizsgálatok II.).

A oro-faringeális daganatok kiemelt területe az onkológiai kutatásoknak. Az aktualitást a daganatos megbetegedések abszolút értékben is nagy száma, 1970 óta 4,5-szeresére emelkedett, és az a trend is biztosítja, hogy arányaiban is nő mind a férfiak, mind a nők körében. Magyarország európai viszonylatban is vezető helyen van a fej-nyaki daganatok okozta halálozási statisztikákban (64). A múlt század közepe óta a halálozás hazánkban több, mint a háromszorosára nőtt, jelenleg 16/100000 lakos (28/100000 ffi., 4,5/100000 nő halálozás), és az elmúlt években ez a tendencia nem változott (64). A magyarországi össz-daganatos halálozás több, mint 5%-át adják a fej-nyaki daganatok. Éves szinten ez kb. 2500 fő halálozást jelent (20,21,64). A klinikai gyakorlatban talált adataink (PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika beteganyaga) megegyeznek a nemzetközi irodalom adataival, ezért határoztuk el a száj-garatüregi daganatos megbetegedések komplex megelőzésének vizsgálatát állatkísérletes modellben és humán szövetekben, olyan korai biomarkereket használva amelyeket az irodalom jellemzőnek tart az oro-faringeális daganatok leírásakor és elemzésekor (22). Vizsgálataink során olyan fej-nyaki, laphám eredetű folyamatokat vizsgáltunk, melyek a malignus elváltozások 90 %-át adják az oro-faciális és nyaki régiókban. Mivel Magyarországon a prevenció erőfeszítések tekintetében csak modell-kísérletek folynak, a helyzet nem javul (3. ábra).

A laphámrákok szövettani típusai: a.) elszarusodó laphámkarcinóma, b.) el nem szarusodó laphámkarcinóma, c.) anaplasztikus karcinóma. A szövettani csoportosítás korrelál a klinikai prognózissal, mert az érett típusok kezelhetősége lényegesen jobb, mint az anaplasztikus,



éretlen folyamatoké. A fej-nyaki daganatok esetében a túlélési esély a definitív diagnózistól számítva változó, akár 50% alatt is lehet az ötéves túlélés tekintetében, vannak típusok, ahol 25% alatti (20). A gyakori késői orvoshoz fordulás miatti késői felismerés korlátozza beavatkozásunk esélyeit. Annak ellenére, hogy a fej-nyaki tumoros folyamatok java része laphámkarzinóma, szövettanilag jól osztályozható, kidolgozott sugár-, kemoterápiás és műtéti protokollok állnak rendelkezésre, a kezelésbe vett betegek túlélése nem változott utóbbi évtizedek alatt (23).



**3. ábra. Fej-nyaki daganatok okozta mortalitás Magyarországon  
(Kiss, Ember 2005)**

## **2/a. A fej-nyaki daganatok etiológiája, főbb rizikótényezők a tumorgenezis molekuláris biológiája**

Jelen dolgozatban, a fej-nyaki régióban a tumoros megbetegedések több mint kilencven százalékát adó laphámkarcinómákkal foglalkozunk. Sajnos betegeink java része III.-IV. TNM stádiumban kerül felismerésre, s a helyi folyamatot távoli, azonos vagy ellenoldali metasztázisok súlyosbítják. Az I.-II. TNM stádiumú betegek kemoterápiával, műtéti és radioterápiával jól gyógyíthatók (24). Az elfogadható megoldás, a fej-nyaki tumorok esetében is a primer és szekunder prevenció lenne. A primer prevenció, vagyis az elsődleges megelőzés a daganatkiváltó ágenssel való találkozás elkerülését célozza.

A szekunder prevenció a minél korábbi diagnózist jelenti, lehetőleg még kurábilis stádiumban. Éppen ezért igen hatékony laboratóriumi és molekuláris biológiai technikákat használ, a premorbid stádium minél korábbi szakaszaiban. Ez alapja lehet a szűrőrendszereknek. A terciér prevenció a gyógyult betegekben a relapszus kialakulását hivatott megelőzni, így a gondozás, a rehabilitáció és életvezetés mellett a recidívák és metasztázisok kialakulásának a megelőzését célozza. A primer és szekunder prevenció közötti terület nem határolható el élesen, hiszen a korai molekuláris biológiai jelek, ha specifikusnak bizonyulnak, akkor a szekunder prevenció eszköztárába tartoznak. Ha egészen korai stádiumban vannak, amikor a daganat ki sem alakult, a primer prevenció eszközei (62). A dohányzás, az eltérő dohányzási szokások, az alkoholfogyasztás és a késői orvoshoz fordulás az, amely elsősorban fokozza a fej-nyaki daganatok incidenciáját és mortalitását. A dohányzás a fej-nyaki daganatok esetében a kockázatot két-háromszorosára emeli, ez a kockázatfokozódás a szájüregi és nyelőcsőrákok esetében öt, hatszoros (25). Közismert, hogy legalább tíz daganatfajta esetében emeli a dohányzás a rizikót, az elszívott cigaretták száma, a dohányzás módja, minősége és a dohányzás megkezdésétől számított idő függvényében. Ugyanez a kockázat fokozódás kimutatható az alkohol-koncentráció függvényében is, egyes alkoholfajták – elsősorban tömény italok fogyasztása kapcsán. Ezek a daganatok elsősorban a rossz szociális és higiénés helyzetben lévő populációt sújtják. Ezért az egészségügyi prevenció programok adhatják a megelőzés alapját, hiszen a primer prevenció horizontális programjai kevésbé hatékonyak.

A fej-nyaki daganatok esetében a környezeti, életmódbeli koncepció megalapozottnak látszik, de természetesen genetikai alapon érvényesül. A dohányzás és alkoholfogyasztás *szinergizmusa* a retrospektív elemzések alapján vezetett arra a következtetésre, hogy a kettő együttes hatása akár a rizikót akár tízszeresre is növelheti (26,27). Az I.sz. táblázatban tüntettük fel azokat a rizikótényezőket, melyek fontosak az oro-faringeális daganatok kialakulásában.

Az II. táblázatban jellemző genetikai változásokat tüntettünk fel. Így a *ras*, az *int2*, a *myc* és a *p53* gén szerepe bizonyítottan tekinthető. Az alább ismertetendő irodalomban található genetikai eltérések alapján igazolható a fenti gének szerepe az oro-faringeális rákok kialakulásában.

**I. táblázat. Rizikótényezők oro-faringeális laphám daganatok esetében  
(Németh 2005)**

Környezeti:	Dohányzás, alkoholfogyasztás (és a kettő szinergizmusa) Passzív dohányzás Bételdió rágás
Infektív:	Candidiasis HIV infekció Egyéb vírusinfekciók (HPV , HSV)
Szisztémás:	Krónikus vashiány

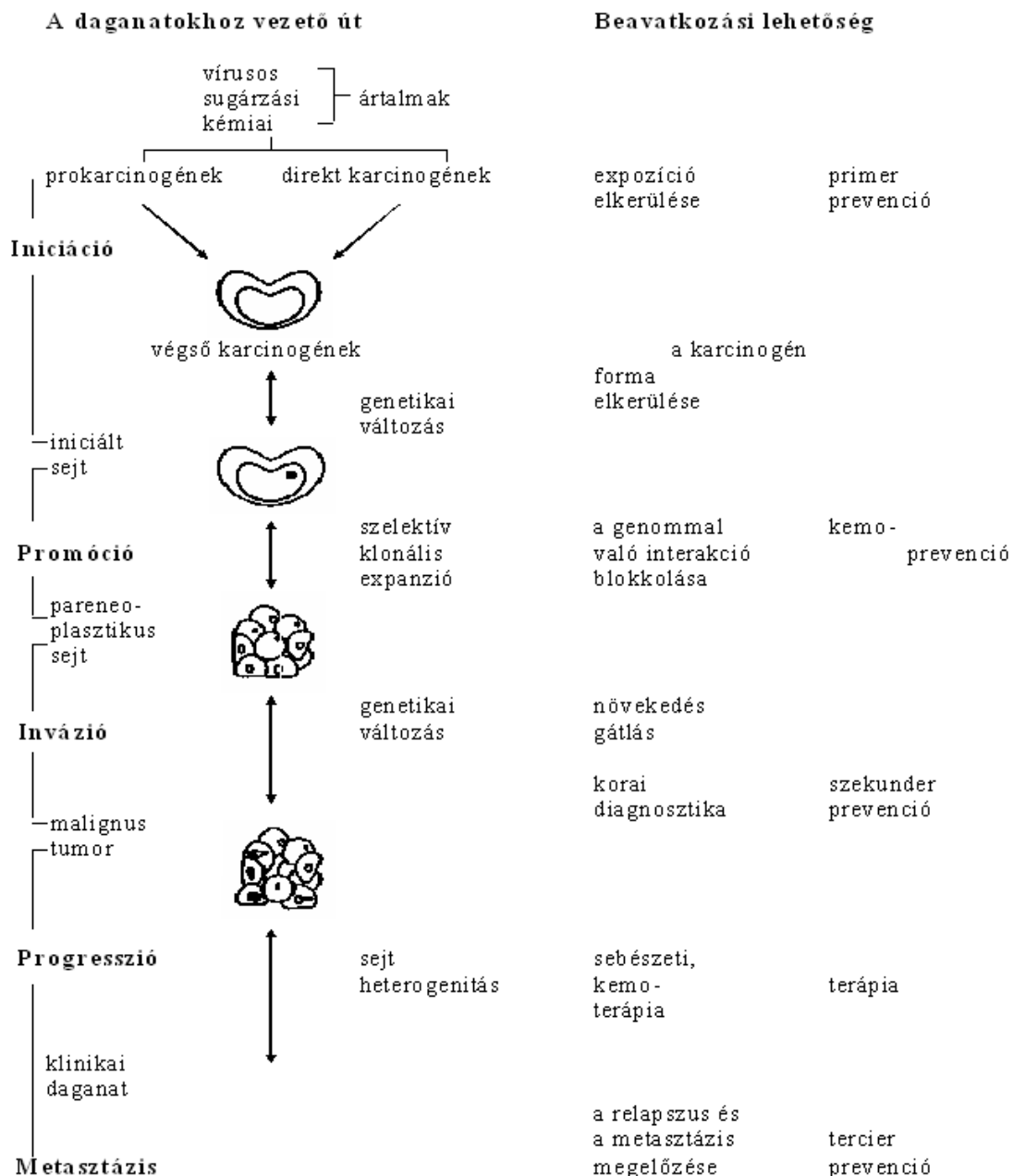
**II. táblázat. Néhány jellemző onko-genetikai változás oro-faringeális laphám  
karcinómák esetében (Németh 2005)**

Onkogén aktiváció:	<i>ras</i> mutáció, <i>int-2</i> amplifikáció, <i>myc</i> , <i>ras</i> , <i>erbB1</i> overexpresszió
Szuppresszorgének:	<i>p53</i> , <i>p63</i> expresszió fokozódás
Deléció:	<i>1q22</i> ; <i>11p13</i> kromoszóma töréspontok

A malignus folyamatok kialakulása több, külön-külön is karcinogén hatásnak köszönhető(multifaktoriális kóreredit). Ezt a folyamatot, mely a rákos elfajuláshoz vezet, nevezzük **"multistage carcinogenesis"**-nek (többlépcsős daganat kialakulás), lépései a 4. és 5. ábrán láthatók (26,28).

Az első lépés során a karcinogén anyag és a DNS kölcsönhatása jön létre, mely genotoxikus elváltozást hoz létre. Ha nem, epigenetikus hatásról beszélünk. A genotoxikus hatás akkor vezet daganatos folyamat folytatódásához, ha stabilizálódik a genomban létrejött változás. Ezt nevezzük iniciációnak, mely gyors folyamat. A második lépés a promóció, lényegesen lassabban megy végbe. Az iniciált klón növekedése preblasztomatózist hozhat létre, mely ez

esetben lehet nyálkahártya polipus vagy orális leukoplákia. A prekancerotikus állapot nem feltétlenül vezet malignus folyamat kialakulásához, az esetek kisebb részében előzi meg azt. Klinikailag sokkal gyakrabban látható manifeszt malignóma, mint a „klasszikusan” prekancerotikus folyamatból kialakuló rákos folyamat. A folyamat folytatódásával létrejön a progresszió, az invazív karcinóma kifejlődése, melynek minden lépése további szomatikus mutációt feltételez (29,30) (4.ábra).



4. ábra. A daganatok kialakulásának többlépcsős modellje (Ember, Kiss, Sándor 2006)

A tumorgenezis során nagyobb terület kerül karcinogén expozíció alá, nem csak az a régió, ahol a tumoros elfajulás létrejött ("**field of cancerization**"). Nagyszámú tumoros beteg biopsziás anyagaiban a szövettani vizsgálatok során a primer tumortól függetlenül voltak egyéb diszpláziás, hiperpláziás és hiperkeratotikus területek. Ha a tumor egy cm-nél kisebb volt, abban az esetben is sokszor találtak független, in situ karcinómát (28). Arra a megállapításra jutottak, hogy a karcinogén expozíció nagy területen, irreverzibilisen prekondicionálta a találati terület szöveteit, így a malignus elváltozás kialakulása elkerülhetetlen. A megfigyelés, miszerint a tumor képződés nem egyetlen lókuszban folyik, tehát sokszoros primer góc létezik, nem új. A klinikailag gyógyultnak tűnő betegnél a második primer, vagy szekunder tumor kialakulás valószínűsége is igen magas, mely lehet a kemoterápia hatása is (31, 32).

## **2/b. A biomarkerek és vizsgálómódszereik**

A molekuláris és prediktív epidemiológia lényege, hogy bevezetésre kerülnek olyan új, korai biomarkerek, amelyek vizsgálatával pontosabban, korábbi stádiumban leírhatók és vizsgálhatók az epidemiológia által is vizsgált folyamatok. A biomarkerek alkalmasak az expozíció-betegség folyamat valamely, akár molekuláris szintű stádiumának jellemzésére. A 1. és 2. ábrán látható a molekuláris epidemiológiai módszerek jelentősége a megelőzésben és gyógyításban. A molekuláris epidemiológiai markerek segítségével leírható és vizsgálható az expozíció ténye, vagy a korai biológiai elváltozás, még akkor is, ha ez viszonylag kis mértékű, így a primer prevenció eszköztárában ezek a módszerek jól használhatók. Az expozíció és a betegség kialakulásának korai jeleit észlelhetjük genetikai/genomikai szinten, amikor az elváltozás fenotípusosan még nem látható. Azonosíthatók a fokozottan veszélyeztetett, exponált páciens csoportok, amelyek olyan rizikótényezőkkel rendelkeznek, hogy a gyakorlati prevenció kérdéseket fel lehet vetni. Nem kevésbé fontos az a szerep melyet egyes betegségek prognózisának becslésekor és az egyéni érzékenység vizsgálatában játszanak a biomarkerek. Lényeges annak feltárása is, hogy az egyéni fogékonyság milyen mértékben határozható meg, hiszen csak az exponáltak egy részénél fejlődik ki a betegség. A molekuláris epidemiológia továbbá pontosabb lehetőséget teremt a kockázatbecsléshez (1,2,32,33).

Azokat a géneket, melyek a daganatkialakulás során aktiválódnak, onkogéneknek nevezték el. Kiderült, hogy ez nem homogén csoport, hanem különböző szerkezetű és funkciójú fehérjéket kódoló gének (26,34). Közös bennük, hogy normál körülmények között a sejtnövekedéssel, sejtosztódással kapcsolatos szabályozó funkciókért felelősek, éppen ezért vezethetnek rendellenességeik kontrollálatlan osztódáshoz. A sejtben normálisan meglévő ilyen géneket proto-onkogéneknek nevezzük, ezek akkor válnak onkogénné ha aktiválódnak. A proto-onkogének aktivációja számos mechanizmussal történik: pontmutáció, génamplifikáció, illetve a génexpressziót szabályozó rendszer megváltozása kapcsán (kromoszómaátrendeződés, vírusintegráció).

A daganat kialakulásában felelőssé tehető gének másik lényeges csoportját a tumorszuppresszor gének képviselik. Ezek a gének a daganat kialakulást gátolják, az abnormális növekedés, osztódás szabályozásával.

A molekuláris epidemiológia vagy makromolekulákat (DNS, RNS, kisebb részben fehérjék) vagy kismolekulájú metabolitokat tanulmányoz (35, 36, 37). Első lépés a sejtbe kerülő anyag magba jutása, majd a DNS-hez kapcsolódása kovalens kötéssel (38). A DNS adduktok vizsgálata igen pontos eredményt adhat az expozíció sejtszintű mértékéről, de nem mindig vizsgálhatók, vagy csak bonyolult és költséges eljárással. Az adduktok vizsgálata abban az esetben is jó módszer, ha a környezeti karcinogén hatása ismert. Azok a változások, melyek a DNS-ben történnek detektálhatók a DNS izolálásával, majd mutációk, génamplifikációk, kromoszóma aberráció vizsgálatával, amelyek azután egyes géntermékek struktúráját, funkcióját megváltoztatják, vagy a génexpresszió mértékét befolyásolják (3).

Állatkísérletes modellben kialakítható az emberi laphámkarcinóma analóg modellje. A szíriai aranyhőrcsög pofazacskó nyálkahártyán karcinogén adására alakul ki a daganat (39). Fontos, hogy ilyen tumor spontán nem alakul ki, csak karcinogén expozíció hatására. Sokkal gyorsabb a folyamat, mint emberben és minden lépésében követi a többlépcsős daganat kialakulás elvét. Először hiperkeratózis, krónikus gyulladás jön létre négy-hat héttel a *DMBA* applikációja után, második lépésben diszplázia mutatható ki szövettanilag az exponált területen. Hat-nyolc hét után leukoplákia látható, majd nyolc-tizenkét hét múlva kialakul az invazív karcinóma.

Más állatkísérletes modell igazolta a vírusok szerepét is a karcinogenezisben. HIV vírussal emelhető volt, az előzetesen karcinogén vegyületekkel kezelt állatokban, a daganatok előfordulásának aránya. Fontosabb azonban, hogy HPV-vel orális daganatok voltak indukálhatók, melyekben, nagy százalékban volt DNS papilloma vírus kimutatható (40).

A genetikai anyag vizsgálata során sokféle más változást is találtak. Az egyik változás lehet a sejtek DNS tartalmának megváltozása (41). A DNS tartalom növekedése, az aneuploiditás, gyakori adat tumorokban, de a premalignus folyamatokra is igaz. Ennek fokozódása jellemző a folyamat előrehaladtával. A citogenetikai vizsgálatok is igazolták, hogy specifikus genetikai változások szükségesek a karcinogenezishez, azonban a tumorok és a premalignus elváltozások citogenetikai vizsgálata gyakran nehezen kivitelezhető, a mitotikus sejtek kis száma és a kromoszómák terítettségének nem egyenletes volta miatt (26,42,43).

## **2/c. Az oro-faringeális daganatok karcinogenezise során kialakuló génszintű elváltozások**

### **• Kromoszóma aberrációk**

A genetikai vizsgálatok során a heterogenitás volt, ami először kiderült. A fej-nyaki lap hámrákok nem voltak egyetlen eltéréshez köthetőek, ahogy más tumorok sem. Három fő csoport jelent meg. Az első elváltozás csoport a tumor inváziójáért felelős aberrációk összessége. A második a progresszióért, a harmadik csoport a random jelentkező, nem konzekvens elváltozások együttese. Oro-faringeális tumorokból 264 töréspontot írtak le. Megállapították, hogy a 1p22 és a 11q13 citogenetikai aberrációk lehetnek legszorosabb összefüggésben a fej-nyaki laphám rákok kifejlődésével (26.).

### **• Allél hiány**

Annak ellenére, hogy a *Ha-ras* gén esetében gyakran figyelték meg a génexpresszió emelkedését, a fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben, más eltérés is látható volt. A 11-es kromoszóma rövid karján a *Ha-ras* lókuszbán előforduló deléciót 10 esetben figyelték meg 46 betegből (6,7).

### **• Tumorszuppresszor gének**

**p53** Az emberi rákok kialakulásában két fő géntípus vesz részt. Az egyik az onkogének csoportja, mely a malignizálódásért felelős, a másik a szuppresszor géneké, melyek a tumoros elfajulást hivatottak megelőzni, ezek inaktiválódása vagy csökkent expressziója vezethet a malignizálódáshoz. A *p53* fehérje alacsony szinten termelődik nem transzformált sejtekben,

míg mutációt követően emelkedett a szintje. A termelődés növekedése mérhető, így indikátora lehet malignus folyamatok kialakulásának (44). A *p53* pro-apoptotikus gén, amely DNS károsodás esetén  $G_0$  fázisban tartja a sejtet, amíg a DNS repair el nem végzi a szükséges korrekciókat (13,14,32,39) (III.táblázat).

### III. táblázat. A *p53* gén funkcióját befolyásoló fontosabb behatások (Kövesi 2004)

- Hipoxia
- DNS sérülés
- Onkogén aktiváció (*ras*)
- Vírushatás(HPV16)
- Nukleotid depléció
- Mutáció
- Más a *p53* átírásához szükséges gének sérülése (*MDM2*)
- Polimorfizmus (4 exon-72 kodon)

Ezt vizsgálta *Field, Spandidos és Lamothe* molekuláris epidemiológiai modellben 100 betegen. A *p53* és a *ras p21* gén szerepét tanulmányozták a dohányzási és alkoholizálási szokások tükrében. Azt találták, hogy a kettőt együtt vizsgálva a *ras* pozitív *p53* negativitás nött egyértelműen párhuzamosan a dohányzással, míg a *ras* negativitás *p53* pozitivitása mérsékelten erős és az erős dohányosoknál emelkedik a *ras* negatív *p53* negatív csoport aránya a nemdohányzók csoportjában a legmagasabb. A *ras* pozitív *p53* pozitív csoport mind a mérsékelten erős, mind az erős dohányosok között emelkedett volt. A *p53* önálló vizsgálata azt mutatta, hogy *p53* pozitívitas elsősorban az erős dohányosoknál volt kimutatható, de emelkedett az állandó és mérsékelt dohányosok körében is. A *p53* emelkedett szintje igazolható volt az erős dohányzás mellett az erős alkoholizálással kapcsolatban is (10)

Más szerzők vizsgálták a peritumorális, épnek tűnő szövetekben a *p53* aktivitást. Azt találták, hogy a *p53* vad típus mutáció mellett a tumor recidíva nagyobb valószínűséggel következik be és a tumor recidíva gyakrabban volt poliklonális, tehát második primer tumorról lehet szó az esetek többségében (8,9,14,32,37).



**p63** A *p53*-mal kapcsolt gén, strukturális és funkcionális homológiával. Képes DNS-hez kötődni, transzaktiválni a *p53* rezponzív géneket és képes apoptózist indukálni. Alulszabályozottságát találták egyes elszarusodó garatrákokban (44).

#### • **Onkogén overexpresszió**

A fej-nyaki rákok kifejlődésének hátterében több onkogén kaszkádszerű overexpresszióját sikerült bizonyítani. Még nem feltárt milyen módon aktiválódnak ezek a gének. Ez lehet mutáció, amplifikáció, átrendeződés és ismert olyan eset mikor nem találtak genetikai változást onkogén overexpresszió mellett. Ilyenkor az expresszió regulációjának lehet szerepe (11,12).

**Ras.** RNS hibridizációs technikával kimutatták a *Ha-ras* és a *Ki-ras* onkogének emelkedett expresszióját több típusú tumoros betegnél. A *Ha-ras* által kódolt fehérje, mely a membránban elhelyezkedve a GTP-GDP hidrolizist katalizálja, a mutációt követően fennmarad, és a GTP-ras komplex állandó proliferációs stimulust küld a mag felé. A tumoros betegeknél emelkedett a p21 fehérje szint, mely a *Ha-ras* expressziójához kötött, ellentétben a leukoplakiás esetekkel. A prognózis szempontjából jobbák voltak p21 negatív betegek esélyei. Valószínűleg a *Ha-ras* gén általában az iníciációban játszik szerepet (6,7)

**Myc.** A *c-myc* gén a sejtproliferáció kontrolljában játszik szerepet és bár a mechanizmus nem teljesen ismert valószínű, hogy emelkedett expressziója szerepet játszik a malignus transzformációban. Azt is feltételezik, hogy a *p53* a *c-myc* génen keresztül hat az apoptózis folyamatára. A kettős vizsgálat (*p53*, *c-myc*) fontos lehet a tumor agresszivitásának megítélésében és valószínűsíthető, hogy a *c-myc* overexpresszió és a *p53* funkció-hiány fontos szerepet játszik a fej-nyaki laphám eredetű folyamatok kialakulásában (14). Az emelkedett szint több kutató által igazolt, sokféle szövettani típusú tumorok esetében, de nem sikerült az emelkedett *c-myc* mRNS szint és „tumor staging” között korrelációt találni. A tumor inváziós frontjában viszont emelkedettebb volt a *c-myc* mRNS szint, mint a tumormassza központi részeiben. Ez további kérdéseket vet fel a *c-myc* gén invázióban játszott szerepét illetően. További vizsgálatok, mely a p62 *c-myc* fehérje vizsgálatát célozták nem találtak összefüggést a fehérjeszint és a klinikopatológiai paraméterek között (13,14,45).

**ErbB-1.** Igazolták az *erbB-1* gén overexpresszióját a fej-nyaki laphámrákos esetekben, de ezt nem sikerült a „tumor staging-gel”, a klinikai állapottal és a tumor lokalizációjával összhangba hozni (15,16).

**ErbB-2 onkogén.** Az *erbB-2* onkogén homológ az EGF receptorral. Az *erbB-2* fehérje egy transzmembrán protein, tirozin-kináz aktivitással. Sok szerző talált az *erbB-2* pozitívítás és a

mellrák között összefüggést, de ezt e fej-nyaki laphámrákok eseteiben nem sikerült igazolni (15,16,44).

***Bcl-2, Bax, Cadherin E.*** Megállapították, hogy a metasztatizáló fej-nyaki daganatokban a *Bcl-2* szint négyszer magasabb volt, mint a nem metasztatizáló daganatokban. A *Bax*- és a *Cadherin E* esetében az ellentétes változások voltak igazak. Valószínűsíthető, hogy a *Bcl-2* az apoptózis gátlásán keresztül valósítja meg hatását, míg a *Bax* apoptózist stimuláló hatása kevésbé jut érvényre a metasztatizáló tumorok eseteiben. A nem metasztatizáló tumorok *Cadherin E* szintje magasabb, mint a metasztatizáló tumoroké (32).

***Ciklin D, p16, E2F1*** A vizsgálatok kimutatták, hogy az *E2F1* és a *Ciklin D* a recidívákban magasabb, mint a primer tumorban. Ezzel szemben a *p16* a primer tumorban volt magasabb, mint a rekurrens daganatokban. Nyelvkarcinómák eseteiben kimutatták a *Ciklin D1* overexpresszióját, mely a recidívák eseteiben kétszerese volt a nem recidív tumorokhoz képest (32,37,44).

#### • Egyéb genetikai változások

A genom kvalitatív és kvantitatív eltérései is szerepet játszanak a kontrollálatlan daganatos sejtproliferációban. Nagyszámú gént találtak, melyek amplifikációja overexpresszió nélkül is kapcsolatba hozható a tumorok kialakulásával. Némely tumorban a proto-onkogén amplifikáció a rossz prognózis és agresszív tumor fenotípus jele. A *myc*, *ras*, *erbB-1*, *erbB-2* és *raf* gének azok melyek vizsgálata leginkább előtérbe került az elmúlt években (17,18,32). A *myc*-gének aktivációja, legyen oka átrendeződés vagy amplifikáció, sokszor leírt eltérés emberi tumorok eseteiben (13). Bizonyították a *c-myc* és *N-myc* amplifikációját laphám rákos mintákban. Később sikerült korrelációt találni az *L-myc* gén mintázata és a differenciáltsági fok és a tumor mérete között is (7,10).

A *ras* gének családja három fő csoportból áll, a *H-ras*, *K-ras* és az *N-ras*, rendkívül hasonló fehérjéket kódolva, melyek GTPáz aktivitással bírnak, és a citoplazmamembrán belső felszínén helyezkednek el. A *H-ras* gén amplifikációja nem bizonyított, de a *K-ras* és *N-ras* amplifikációját már leírták fej-nyaki laphámrákos esetekben (6). A transzlokációt sem sikerült igazolni. Mutációkat találtak állatmodellekben, ahol karcinogén adására egérben a *ras* gén 61-es kodonjában sikerült mutációt bizonyítani papillómákban és karcinómákban is. Ebből az a következtetés vonható le, hogy mivel a mutáció pre-malignus lézióban és malignómában is bizonyítható, e géncsoport felelős a malignus átalakulás beindításáért. Ezek a bélben előforduló polipusok esetében is igazak (7,39,46).

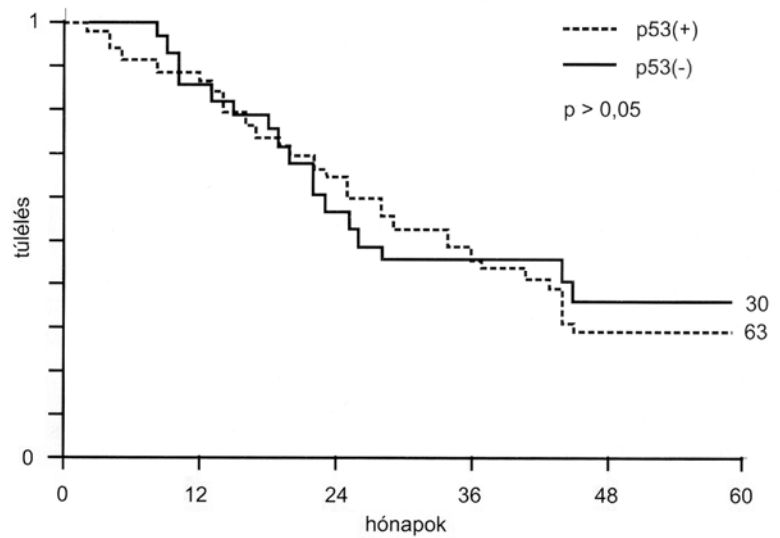
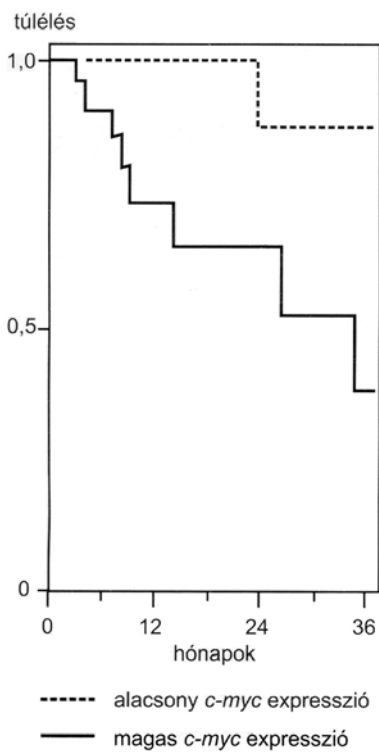
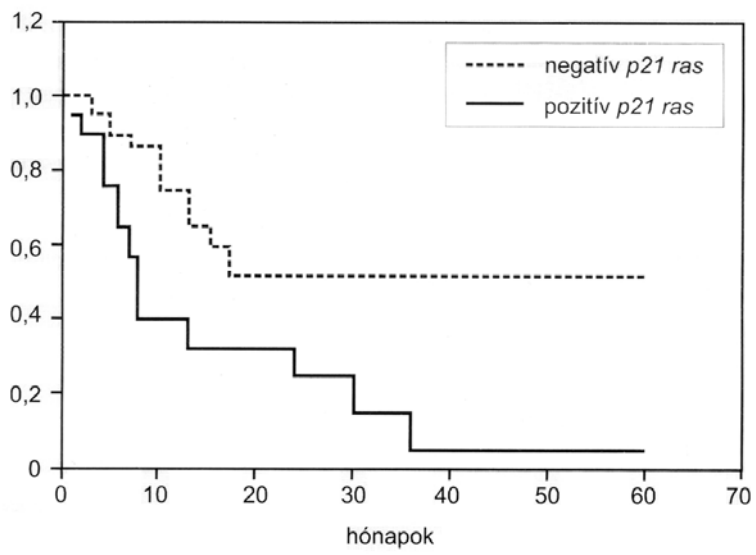
Az *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) transzmembrán polipeptid mitogén aktivitással. Feltételezik, hogy az *erbB-1* onkogén proto-onkogénje lehet. A gén amplifikációját találták fej-nyaki daganatokban. Még nem bizonyított szerepe a fej-nyaki rákok kialakulásában. A *neu/erbB-2* onkogén szerepét más tumorokban sikerült tisztázni, a fej-nyaki folyamatokkal azonban nem sikerült összefüggésbe hozni, szemben az előző változásokkal.(15,16).

Az *int-2* onkogén expresszió változását régebben gyakran említették a fej-nyaki rákok eseteiben. Valószínűsíthető kapcsolatban áll a FGF (fibroblaszt növekedési faktor) géncsaláddal. A megelőző vizsgálatok sokféle emberi daganatos betegben kimutatták amplifikációját (nyelőcső, emlő). Nem meglepő, hogy a fej-nyaki daganatos esetekben is sikerült szignifikáns emelkedést találni az *int-2* amplifikáció és a tumor recidíva kialakulása között (47). Egyes genom stabilitásért felelős DNS MMR (mismatch repair) gén inaktiválódását is megfigyelték a fej-nyaki daganatok eseteiben. Szerzők vizsgálták a gén inaktiválódásának okait, mely lehet mutáció, deléción vagy a promoter régió túlzott metilezettsége (32).

A talált génszintű elváltozások úgynevezett túlélési görbékbe rendezhetőek, melyben a koordinátákon a túlélők számát vonatkoztatjuk a túlélés idejéhez abban a tekintetben, hogy a vizsgált egyedek milyen jellegűek az általunk vizsgált marker tekintetében.

A génszintű elváltozások és a klinikai tapasztalatok vizsgálhatók együtt a *Kaplan-Meier* túlélési görbéken, melyet a 6. sz. ábrán mutatunk be.

A *ras p21* pozitívitas esetében a túlélési görbe sokkal rosszabb, mint a *ras* negativitás esetében. A *p53* génnél kicsit meglepő módon a *p53* pozitívitas túlélési görbéje volt alacsonyabb. A *c-myc* esetében egyértelmű volt, hasonlóan a *ras*-hoz, hogy az alacsony *myc* expresszió jobb, magas *myc* expresszió rosszabb túlélést jelent. Az ilyen típusú vizsgálatoknak elsősorban prognosztikai jelentősége van (prediktív epidemiológia).



**6. ábra. Kaplan-Meier túlélési görbék a *ras*, a *p53* és a *c-myc* gén tekintetében.  
(Ember, Kiss 2005)**

## **2/d. Népegészségügyi, prevenciós és klinikai szempontok**

A fej-nyaki daganatos betegségek számának csökkentése fontos népegészségügyi feladat, mely alapvető prevenciós kérdéseket vet fel. A multikauzális kóreredet ismert, a fej-nyaki régió minimális invazivitással vizsgálható. Cost-benefit vizsgálatok mutatják, hogy a megelőzés igen jelentős megtakarítást eredményezne, hisz a gyógyítás igen költséges, a citosztatikus, a sugár és műtéti ellátás tekintetében is (21).

A dohányzás és alkoholfogyasztás hatása régóta ismert szereppel bír az oro-faringeális daganatok kialakulásában. A két ágens szinergizmusa, mely a közös karcinogén hatást többszörösére felerősíti, szintén ismert. A prevenciós kérdések közül elsőként a primer prevenció az, amellyel foglalkoznunk kell mind az egyén, mind a társadalom szintjén.

Hazánk igen "előkelő" helyen áll a dohányosok számát (Európában a harmadik) és az alkoholfogyasztást (Európában a hatodik) illetően (62,63,64). A dohányzási szokások és az elfogyasztott szeszesital minősége és mennyisége is negatív irányban befolyásolja erőfeszítéseinket. A jövő fontos feladata az egészségnevelés és felvilágosítás segítségével a primer prevenciós erőfeszítések fokozása. Az életmódban tudatos változásokat kell elérni a fejlett országokban bekövetkezett változásokhoz hasonlóan, ahol radikálisan csökkent a dohányosok aránya és az alkohol fogyasztási szokások megváltozása is segíti a fej-nyaki daganatok számának csökkenését. Fontos továbbá a szocio-ökonómiai státusz megváltoztatása is. Ez nemcsak orvosi ténykedés, hanem interdiszciplináris együttműködés, képzési, átképzési, közgazdasági, jogi és törvénykezési feladat. A bevezetőben ismertetett genetikai szintű elváltozásainak nagy része az expozíciós fázisban felismerhető. A korai megelőzés része lehet a kromoszóma vizsgálatok csoportja, a p53, Ha-ras és c-myc gének vizsgálata valamint más génszintű eltérés vizsgálata és felhasználása a szűrésben (1,20,27,48).

A második lépés, mellyel a daganat megelőző állapotok (leukoplákia, lichen stb.) és a kialakult daganatok száma csökkenthető, a premalignus állapotban való felismeréssel, a szekunder prevenció és szűrés. Ennek két lépése a korai diagnózis felállítás és a megelőzés szoros együttese. Fontos szereplők a házi orvos és a fogorvos. Az oro-facialis régió jól áttekinthető, minden elváltozás, mely nem illik a környezetbe, minimális invazivitással vizsgálható és szövettani vizsgálattal pontos diagnózis állítható fel. A fej-nyaki daganatok nagy része epiteliális eredetű és a mukózából indul ki. A szájban korán okoz ulcerációt és vérző, nem gyógyuló hámsérülést. A preblasztomatózisok közül a leukoplákia, amely

malignizálódásra hajlamos és mutatja azokat a szövettani és genetikai elváltozásokat melyek a premalignus elváltozásokra jellemzők (44).

A terciér prevenció és a daganat terápia fontos eszközei a szisztémás kezelésben használt citosztatikumok (III. táblázat)(50). Ezekkel a citotoxikus szerekkel nemcsak a daganatok kezelése során kell foglalkoznunk, hanem visszautalva a primer prevenció kérdéskörére, a terápia után kialakuló a szekunder daganatok, recidívák és metasztázisok megelőzése kapcsán. Klinikai gyakorlatunkban a mitolactol forgalomból való kivonása kapcsán került kiegészítésre az általunk használt *BVM (Bleomycin, Vincristin, Metotrexát)* protokoll *Cisplatinnal*. Ez a platina komplex prototípusa, általánosan használt szer a fej-nyaki daganatok ellátásában (50,51). A platina készítmény használata mellett magasabb loko-regionális recidíva számot találtunk (53). A *Cisplatin* mutagén szer, melyet gyakran használnak mutagenitási vizsgálatokban kontrollként (51,52). Ezek a tények, valamint IARC 2/A besorolás vezettek bennünket a *Cisplatin*, a *Cisplatin* tartalmú protokollok és a *Transplatin* vizsgálatára.

### III. táblázat. Főbb citosztatikum csoportok (Szakolczai 1997)

1. citotoxikus szerek
2. antimetabolitok
3. növényi alkaloidák
4. antibiotikumok
5. vegyes csoport

A kemoprevenció olyan kémiai ágensek használatát jelenti, melyek alkalmasak lehetnek a kialakult prekancerotikus állapot (leukoplákia) kezelésére, remissziót eredményezve, természetesen az irritatív ágensek kiiktatása mellett. Egy tanulmány szerint minősített esetben a leukoplakiás beteganyagban 17,5 %-ban voltak láthatóak malignitásra utaló jelek, de általánosan elfogadott a 4-6%-os malignizáció (21,64). A megoldás lehet sebészi, de a javulásra lehet számítani retinoidok adagolásával és lokális kezeléssel (a dohányzás és alkoholfogyasztás együttes elhagyásával) (1,20,49). Azt is meg kell jegyezni, hogy a

leukoplákia kemoprevenciója nem általánosan elfogadott, álláspontunk szerint ez a kezelés csak átmeneti hatású.

A kemoprevenció legfontosabb eszközei az oralis leukoplákiák esetében a *retinoidok*, ezek közül is a 13-cisz-retinoidok és a béta karotin. A retinol átalakulás után képes kötődni a retinoid receptorokhoz és így képes befolyásolni a transzkripciós faktorokra hatva egyes gének expresszióját. A *karotinoidek* is hasonló hatással bírnak a kísérletek szerint, egyrészt úgy, hogy a béta karotin egyharmada a bélben retinollá alakul, másrészt maga a béta karotin meggátolja a tumor kialakulását. Ez a hatás a makrofágokban termelődő tumornekrózis faktor (TNF- $\alpha$ ) indukciójával alakul ki. Az *E vitamin* is felmerült többek között, mint kemopreventív ágens. Ez a hatás az erős antioxidáns tulajdonságnak köszönhető, a lipid-peroxidáció gátlásával és a szabad gyökök megkötésével. Ismert a *C vitamin* antioxidáns hatása is, bár ez különbözik az E vitamin és a béta karotin hatásmechanizmusától, mert a C vitamin nem zsíroléékony és nem raktározódik a sejtmembránban, így hatását is más módon fejt ki (1,49). Azt is látni kell azonban, hogy a kemoprevenció kisebb súllyal szerepel ma, mint azt megelőzőleg gondoltuk.

Összefoglalva megállapítható, hogy azok a vizsgálatok, melyeket az elmúlt tíz évben végeztek, jó eredményeket hoztak, a molekuláris és prediktív epidemiológiai módszerek alkalmazhatóak, jól hasznosíthatóak, az expozíció feltárásában, a rizikó csoportok kijelölésében, az expozíció mértékének megállapításában és a prognózis becslésekor, de gyakran a korai diagnózisban is. Használatuk fontos a prevenció-intervenció intézkedések irányának kijelölésekor és a prevenció protokollok felállításakor.

### 3. Célkitűzések

1. *CFu(Cisplatin/5-Fluoro-Uracil)* és *BVM(Bleomycin/Vincristin/Metotrexát)* kemoterápiás protokollok összehasonlító vizsgálata állatkísérletben azzal összefüggésben, hogy az intézetünkben korábban kifejlesztett rövid-távú *in vivo* tesztrendszer alkalmas-e a két protokoll hatásának vizsgálatára és a két protokoll milyen onkogén expresszió változásokat okoz a rövid-távú vizsgálat során.
2. A potenciálisan karcinogén (IARC 2/a) *Cisplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata rövid-távú kísérletben az ismert mutagenitás tükrében.
3. A sztereoizomer *Transplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának rövid-távú vizsgálata.
4. Humán vizsgálatok kezelt és kezeletlen tumoros betegeken, a három kulcsgén (*Ha-ras*, *c-myc*, *p53*) alkalmazhatóságának megítélése a prevencióban és a predikcióban.
5. A génexpresszió vizsgálata perifériás fehérvérsejtekből. Új biomarker kifejlesztése perifériás vérből a veszélyeztetettség megállapítására.



## 4. Anyag és módszer

A korai, manifeszt daganatot megelőző génexpresszió vizsgálat humán diagnosztikában biomarkerként történő felhasználásának lehetőségét állatkísérletekben teszteltük. A kísérleteket CBA/Ca egereken végeztük. Ezek az állatok kémiai karcinogénekre érzékenyek, korábban és gyakrabban alakul ki bennük daganat és kémiai karcinogénnel indukált génexpresszió változás, amely a H-2 rendszerrel (embernél MHC) hozható összefüggésbe (a szenzitív CBA/Ca egereknek H-2<sup>k</sup> haplotípusuk van(19)). Állatkísérlet során, különböző szervekben (lép, máj, tüdő, csontvelő, tímusz, lép és nyirokcsomó) megfigyelt korai (24-48-72 órával a kezelés után) génexpresszió változásokat mértük. Az eredmények elemzése után következtetünk arra, hogy a gének expresszió változása alkalmas-e biomarkernek. A *slot-blot* technikát egyszerű kezelhetősége és jó kvantifikálhatósága miatt választottuk.

A kísérletek kivitelének részletes leírása:

### **RNS izolálás:**

Előkészítés: A cervikális diszlokációval előlt állatokból származó szerveket fiziológias sóoldattal mostuk, majd TRIZOL (GIBCO) oldatban homogenizáltuk (Ultra Turrax T25 homogenizátor 1 ml / 100 mg szövet).

Izolálás: (1 ml homogenizátumból kiindulva) a TRIZOL oldatban levő mintát szobahőn 5 percig inkubáltuk. 0,2 ml kloroform hozzáadása után a mintát összeráztuk(15 s), majd inkubálás történt szobahőn 2-3 percig. 12000 g-vel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd 0,5 ml izopropil alkoholt adtunk a leszívott felülúszóhoz. Újabb inkubálás szobahőn 10 percig, majd a felülúszót eltávolítottuk. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk, majd vortexelést követően centrifugálás következett 7500 g-vel 5 percig 4 °C-on. A mintát szárítottuk, majd feloldottuk RN-áz mentes vízben. 10 perc inkubálás (55-60 °C-on) következett, majd a minta nukleinsav/fehérje arányát ellenőriztük fotometrálassal ( $A_{260}/A_{280} > 1,8$ ).

### **Az RNS blottolása:**

A blottert DEPC vízben történt egy órás áztatás után fülke alatt megszáritottuk. A membránt (Hybond+, Amersham) beáztattuk 5X SSC-be (DEPC-es) 15 percre. A membránt ráhelyeztük a blotterre (Hoefler) és bekapcsolt szívásnál összeszereltük a készüléket. 50 µl 20x SSC-t (DEPC-es) átszívattunk minden lyukon. A mintákat és a pozitív-negatív kontrollokat (50-50

$\mu$ l) 20x SSC-t (DEPC-es) újra átszívattuk minden lyukon, majd szívás alatt szétszedtük a készüléket. A membrán áztatása következett 0,4 n NaOH-ban 2 percig, majd a membrán mosása DEPC-es 5x SSC-ben 1 percig és UV fixálása 10 percig.

DEPC-víz: Dietil-pirokarbonát 0,1%-os vizes oldata

20x SSC: 87,7 g NaCl, 44,0 g trinátrium-citrát-dihidrát 500 ml-re kiegészítve 2x desztillált vízzel, pH 7,0 (NaOH-val, vagy HCl-el beállítva)

#### **Hibridizálás (Amersham ECL kit-tel):**

Próba jelölése: a próba koncentrációját beállítottuk a kitben levő vízzel 10 ng/ $\mu$ l-re, és denaturálás következett 100 °C-on 5 percig. Jégen 5 percig hűtöttük, majd centrifugálás 5 sec-ig. Azonos mennyiségű jelölő reagens hozzáadása után a jelölő reagenssel azonos mennyiségű glutáraldehid oldatot adtunk hozzá. Rövid (1sec) vortexelést követően újra centrifugáltuk 5sec-ig, majd inkubáltuk 37 °C-on 10 percig.

Hibridizálás: A membránok előhibridizálása 15 percig 42 °C-on 0,125-0,25 ml / cm<sup>2</sup> mennyiségű, a kit-hez tartozó hibridizációs pufferben történt. A puffer leöntése után hozzáadtuk a próbát előmelegített pufferben. Inkubálás történt 42 °C-on egy éjszakán át, majd a 42 °C-ra melegített "primary wash pufferrel" mostuk 20 percig. Az előző mosást megismételtük. 2x SSC-vel mostuk szobahőn 5 percig. A detekciós oldat összemérése (detekciós komponensek 1:1 arányban)(0,125 ml / cm<sup>2</sup> membrán) után, engedték a membránra. Inkubálás szobahőn 1 percig és a felesleges detekciós oldat leitatása következett a membránról. Fóliába csomagoltuk és röntgen kazettába helyeztük. A röntgenfilm behelyezése után a filmet előhívtuk 15 perc elteltével. Új filmet helyeztünk be és előhívtuk 1 óra múlva. Az eredményt Quantiscan szoftver segítségével értékeltük ki.

Primary wash puffer: 360 g urea (karbamid), 4,0 g SDS, 25,0 ml 20x SSC, 1 literre kiegészítve 2x desztillált vízzel

#### **4/a. Állatkísérletes vizsgálatok I.-III.**

Kísérletenként 6-8 hetes, kémiai karcinogenezis iránt érzékeny CBA/Ca (H-2<sup>k</sup>) egértörzs nőtény egyedeként használtuk, 6-6 állatot használva csoportonként. A monoterápiás kísérletekben a platina készítmények testtömeg ekvivalens oldatát adagoltuk intraperitoneálisan egyszeri dózisban (*Cisplatin*, *Transplatin* (0.66mg./1.ml. *i.p.*).

A protokollok esetében, hasonlóan a humán felhasználáshoz, testtömeg ekvivalens dózisokat használtunk a megfelelő időbeli elosztásban (*BVM /Bleomycin, Vincristin, Metotrexat/* és *CFu /Cisplatin,5-Fluoro-Uracil*) (V.táblázat).

**V.táblázat. Alkalmazott protokollok (dózis és alkalmazási idő)**

***BVM* protokoll**

<b>1. nap</b>	Bleomycin	0.026mg
<b>2. nap</b>	Bleomycin	0.026mg
<b>3. nap</b>	Vincristine	0.01 mg
<b>4. nap</b>	Methotrexat	0.396mg
<b>5. nap</b>	Ca-leucovorine	0.04 mg

***C-Fu* protokoll**

<b>1. nap</b>	Cisplatin	0.66mg
<b>2. nap</b>	Fluorouracil	6.6 mg
<b>3. nap</b>	Fluorouracil	6.6 mg
<b>4. nap</b>	Fluorouracil	6.6 mg

A kontroll a megfelelő mennyiségű fiziológias sóoldat volt. 24, 48, 72 órával a kezelés után cervikális diszlokációt követően feldolgoztuk a következő szerveket: tímusz, lép, vesék, máj, mezenterialis nyirokcsomók, tüdő és femorális csontvelő. Az RNS izolálása (54) TRIZOL reagenssel (GIBCO, Grand Island, NY, USA) történt. 260 nm-en történt a fotometrázás, majd hígítást követően HYBOND N<sup>+</sup> Nylon membránra vittük (Amersham, Little Chalfont, England) (slot-blotting). Tíz perc UV fixálás után a mintákat kemilumineszcensen jelölt génpróbákkal hibridizáltuk (*p53,c-myc*: ECL Kit Amersham, Little Chalfont, England és *Haras*: prof.dr.Szeberényi PTE ÁOK Hungary) A konstitutuan expresszázó *β-actin* gén szerepelt kontrollként. A kemilumineszcens jeleket röntgen filmen fogtuk fel, majd számítógépes szkennelés után a csoportátlagok különbözőségét Student-féle t-próbával vizsgáltuk (Quantiscan/Biosoft). Statisztikailag szignifikánsnak a  $p < 0,05$  értéket tekintettük.

#### 4/b. Humán vizsgálatok I.

Négy betegcsoportot állítottunk fel. (PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika beteganyaga; oro-faringeális laphám karcinóma esetei) Kontrollként a klinikán más jellegű megbetegedések gyanúja miatt (pl. Sjögren sy.) végzett kisnyálmirigy biopszia negatív eseteit használtuk 16 vizsgálati esetben. A kezeletlen tumoros csoport 25 páciensből állt (16 férfi., 9 nő). A BVMC kemoterápiával kezelték száma 13 volt (9 férfi, 4 nő). A citosztatikus terápiát két héttel követte a sebészi ellátás, a mintavétel a műtét alakalmával történt. Radioterápiát 10 beteg kapott (összdózis 40Gy) a vizsgálat előtt (7 férfi és 3nő) (VI.táblázat). A besugárzás után tizennégy nappal próbaexcízió történt. Minden esetben a tumor laphámkarcinómának bizonyult a szövettani vizsgálat során (HE festés). A mintavétel után azonnali fagyasztás történt mínusz 70 fokra a minta feldolgozásáig. Az RNS izolálása és az értékelés a fenti módon történt, hasonlóan az állatkísérletekhez.

**VI.táblázat. A humán vizsgálat I. betegcsoportjai**

1. csoport	Kezeletlen tumoros esetek (friss prex.)	16 ffi. 9 nő	áé.: 51.3±4.2 év
2. csoport	BVMC sémával kezelték	9 ffi. 4 nő	áé.: 54.2±5.4 év
3. csoport	Radioterápián átesett betegek	7 ffi. 3 nő	áé.: 56,1±3.8 év
4. csoport	Kontroll	10 ffi. 5 nő	áé.: 50,5±4.4 év

#### 4/c. Humán vizsgálatok II.

Szövettanilag igazolt (HE festés) laphám karcinómában szenvedő páciensekből származó 20 ml vérminta került beküldésre gége-tumoros beteganyagból, melyek 45 páciensből származtak (30 ffi. és 15 nő, átlagéletkor: 56.2±6.2 év) (PTE ÁOK Fül-Orr-Gégészeti és Fejnyak Sebészeti Klinika beteganyaga). Nevezettek nem részesültek még preoperatív kemoterápiában. A kontroll csoport 36 egészséges, nemdohányzó és nem alkoholizáló személyből származott (VII.táblázat). Fehérvérsejteket izoláltunk 0.89 % ammónium-klorid oldattal 500G-n centrifugálva 10 percen át a mintát. Ezután hasonlóan a fentiekhez génexpressziót vizsgáltunk. Vizsgálatunk célja volt, hogy feltárjuk, hogy a perifériás vérből származó fehérvérsejtek gén expresszió vizsgálata mennyire érzékenyen jelzi ezen behatásokat és alkalmas-e a fenti módszer biomarkernek.

## VII.táblázat. A humán vizsgálat II. betegcsoportjai

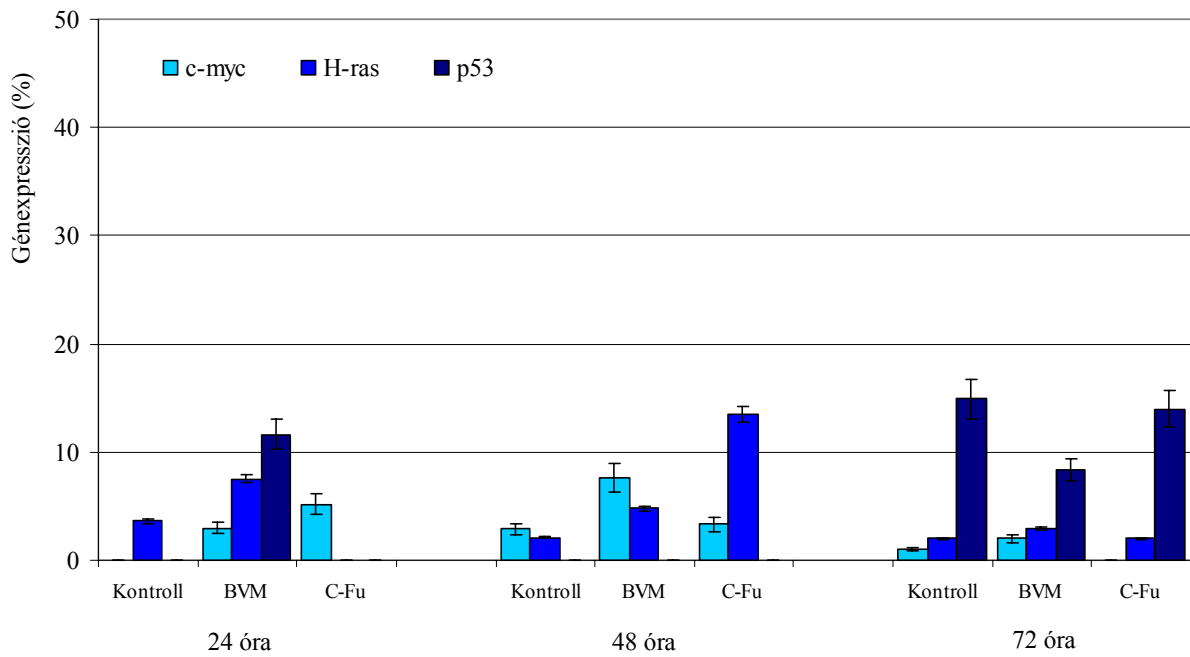
1. csoport	Gége-tumoros betegek	30 ffi. 15 nő	áé.: 56.2±6.2 év
2. csoport	Kontroll	19 ffi 7 nő	áé.: 52.2±4,1 év

## 5. Eredmények

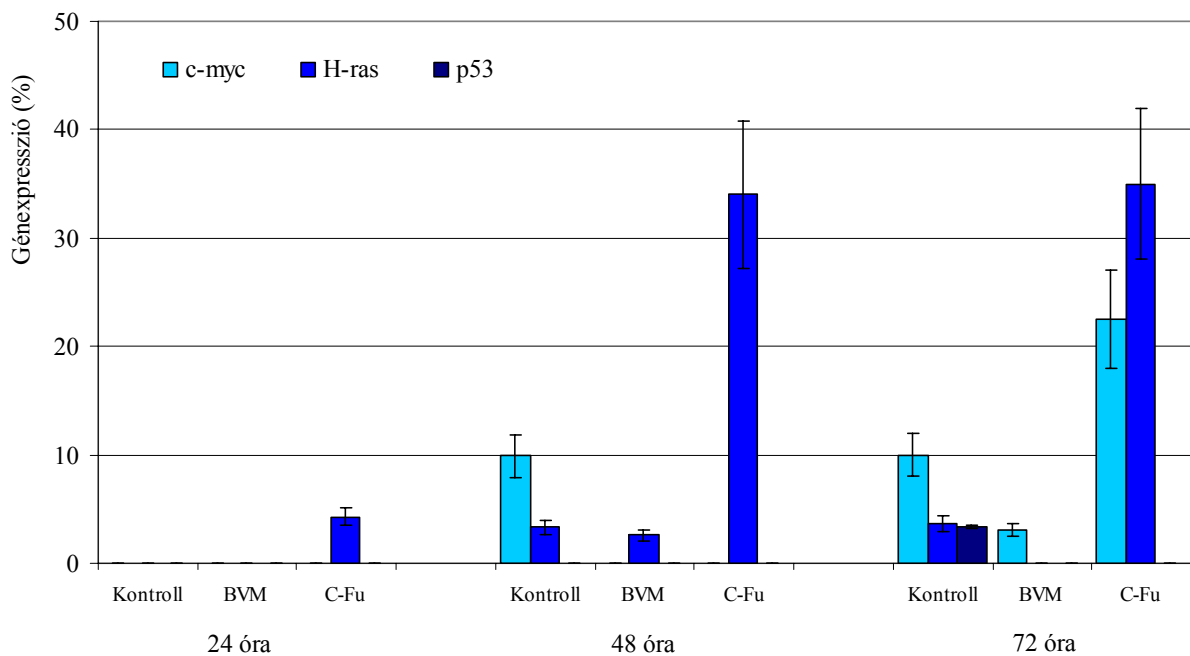
### 5/a. *Cisplatin-5Fluorouracil és Bleomycin-Vincristin-Metotrexát (BVM)* kemoterápiás protokollok összehasonlító vizsgálata állatkísérletben

Az Intézetünkben kifejlesztett in vivo rövid-távú tesztrendszerben a kemoterápiás protokollok korai hatását vizsgáltuk. A kemoterápiás sémák testtömeg ekvivalens mennyiségének intraperitoneális adagolását alkalmaztuk (V.táblázat). Cervikális diszlokációt követően a lép, máj, tüdő, vese, nyirokcsomók, tímusz és csontvelő vizsgálata történt 24, 48 és 72 órával a kezelést követően. A nyirokcsomókban már 24 óra után szignifikáns génexpresszió emelkedést indukált a *CFu* protokoll, míg a *BVM* séma nem okozott definitív hatást, mely 48 óra után nem is volt látható (9.ábra). A lépben hasonló változások voltak detektálhatók, „korai” hatás látható a *BVM* protokoll esetén is, de mérhető hatása a *CFu* sémának volt a *c-myc* és a *Ha-ras* gén esetében (7.ábra). A csontvelőben is hasonló hatást gyakoroltak a protokollok (8.ábra). A kémiai karcinogenezis iránt érzékeny CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzseken a *CFu* (*Cisplatin-5Fluorouracil*) protokoll szignifikánsan magasabb génexpressziót indukált a lépben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben, mint a platina készítmény mentes *BVM* (*Bleomycin-Vincristin-Metotrexát*) séma (7,8,9. ábra)( $p < 0.05$ ). Az ábrákon a vízszintes tengelyen a vizsgált csoportok, a függőleges tengelyen a génexpresszió mértéke látható a  $\beta$ -aktin génhez viszonyítva.

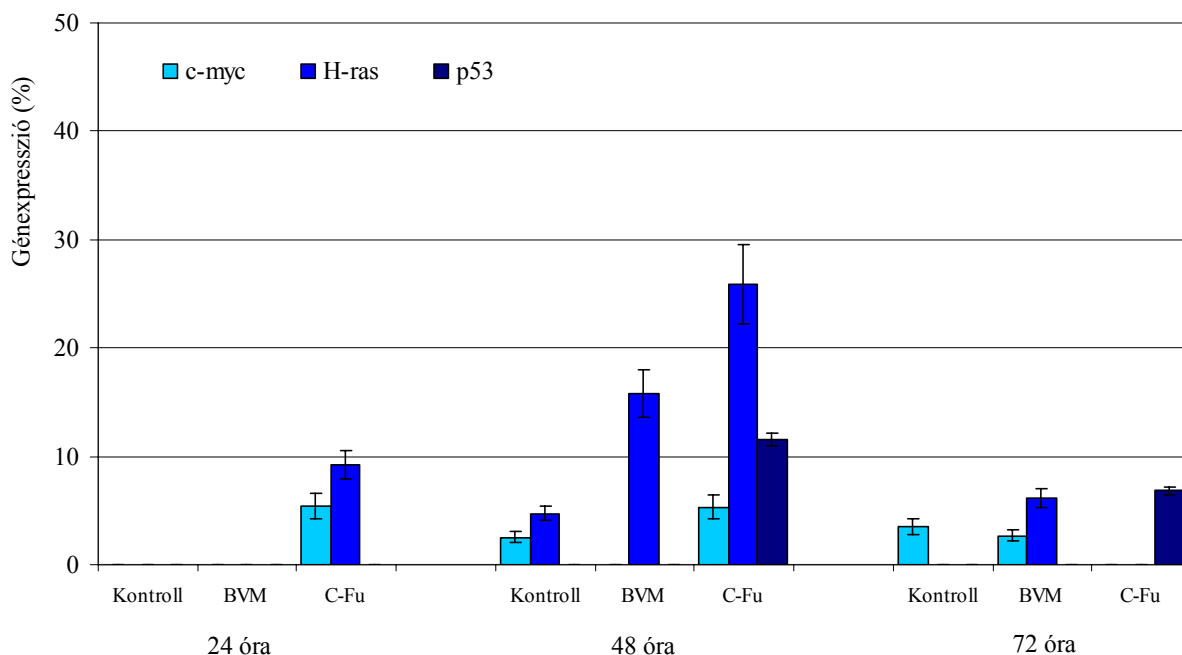
A legtöbb citosztatikus kezelés génexpresszió változásokat indukál, de jelen esetben a *Cisplatin* tartalmú protokoll szignifikáns eltérést okozott a *BVM* sémaéhoz képest. Indokolt volt tehát a *Cisplatin* szerepét felvetni az onko/szuppresszor gének expresszió fokozódásában, de végleges megállapításokhoz a hosszú-távú vizsgálatok után juthatunk.



7. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzs lépében észlelt génexpressziós mintázat 24, 48, és 72 órával BVM és C-Fu kezelés után



8. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzs csontvelőjében észlelt génexpressziós mintázat 24, 48, és 72 órával BVM és C-Fu kezelés után

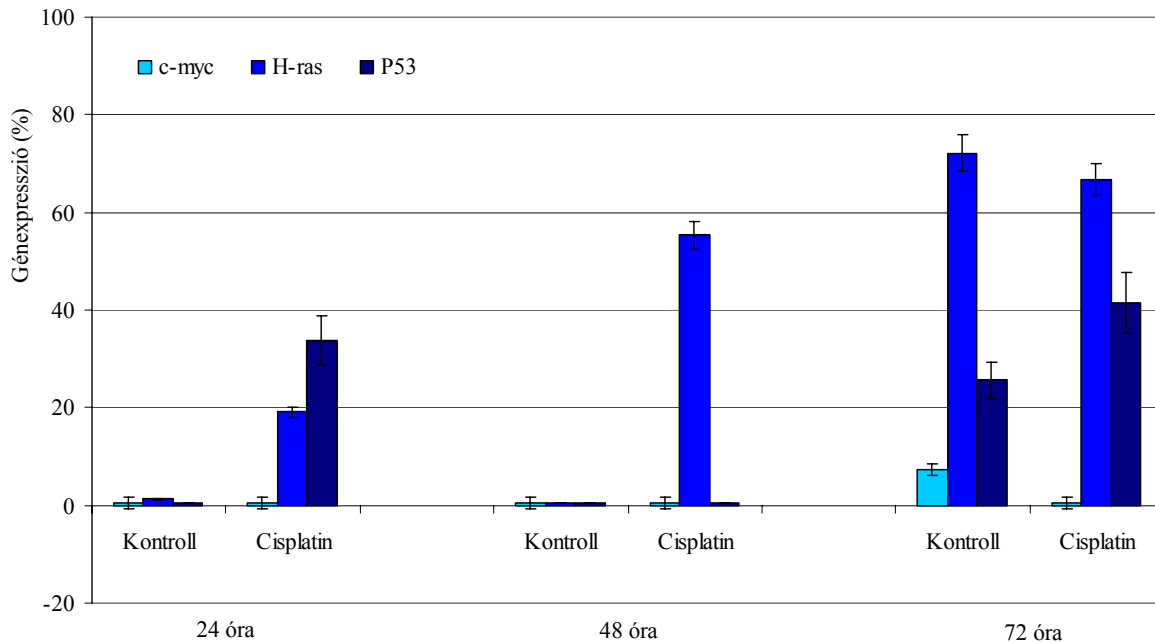


**9. ábra CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzs nyirokcsomójában észlelt génexpressziós mintázat 24, 48, és 72 órával BVM és C-Fu kezelés után**

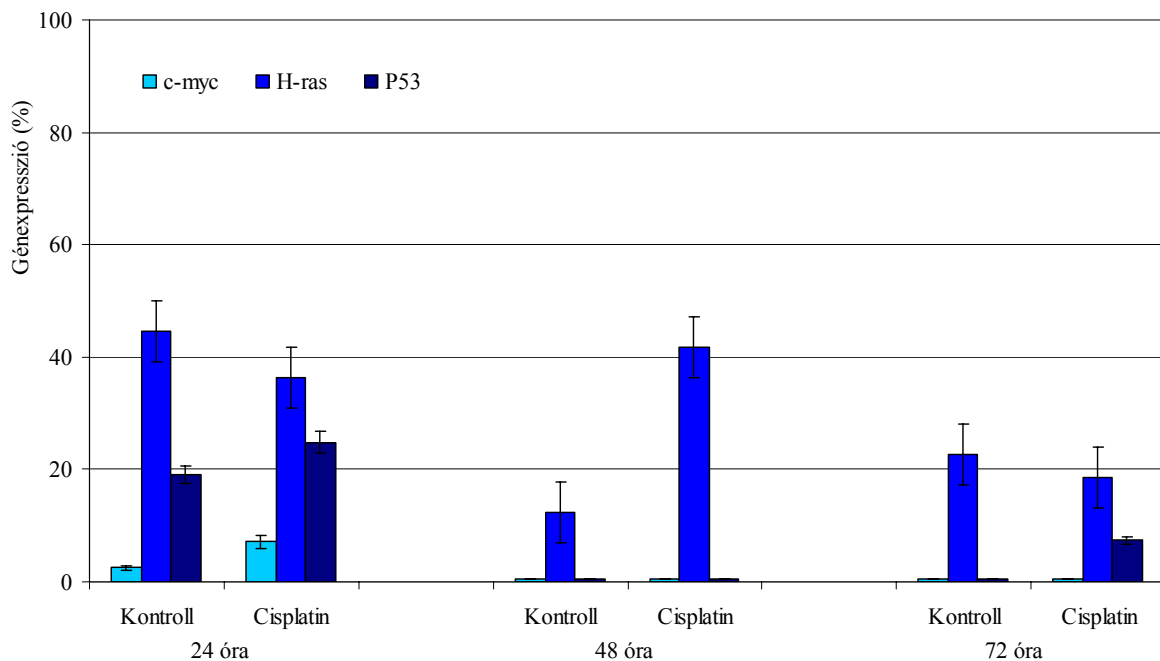
### **5/b. A Cisplatin génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata az ismert mutagenitás tükrében**

Kémiai karcinogenezis iránt érzékeny, CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzs nőtény egyedeket használtuk fel vizsgálatainkhoz(19). A testtömeg ekvivalens mennyiségű anyagot (0,66 mg) intraperitoneálisan adagoltuk, majd cervikális diszlokációt követően szervenként (lég, máj, tüdő, vese, nyirokcsomók, tímusz és csontvelő) mértük az onko/szuppresszor gének expresszió változását a kontrollhoz képest, 24, 48 és 72 órával a kezelés után.

A platina készítmény igen rövid idő után változásokat indukált a tesztrendszerben, azaz a kezelés után a génexpresszió megemelkedik, úgy tűnik, hogy a protokolloknál kialakult hatásokért a *Cisplatin* lehet felelős, nem zárva ki egyéb komponensek szerepét. Szignifikáns változást a csontvelő és a nyirokcsomók vizsgálata kapcsán láttunk.



**10. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egér-csontvelőben meghatározott génexpressziós mintázat *Cisplatin* kezelés után 24, 48 és 72 órával**



**11. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egér nyirokcsomóban meghatározott génexpressziós mintázat *Cisplatin* kezelés után 24, 48 és 72 órával**

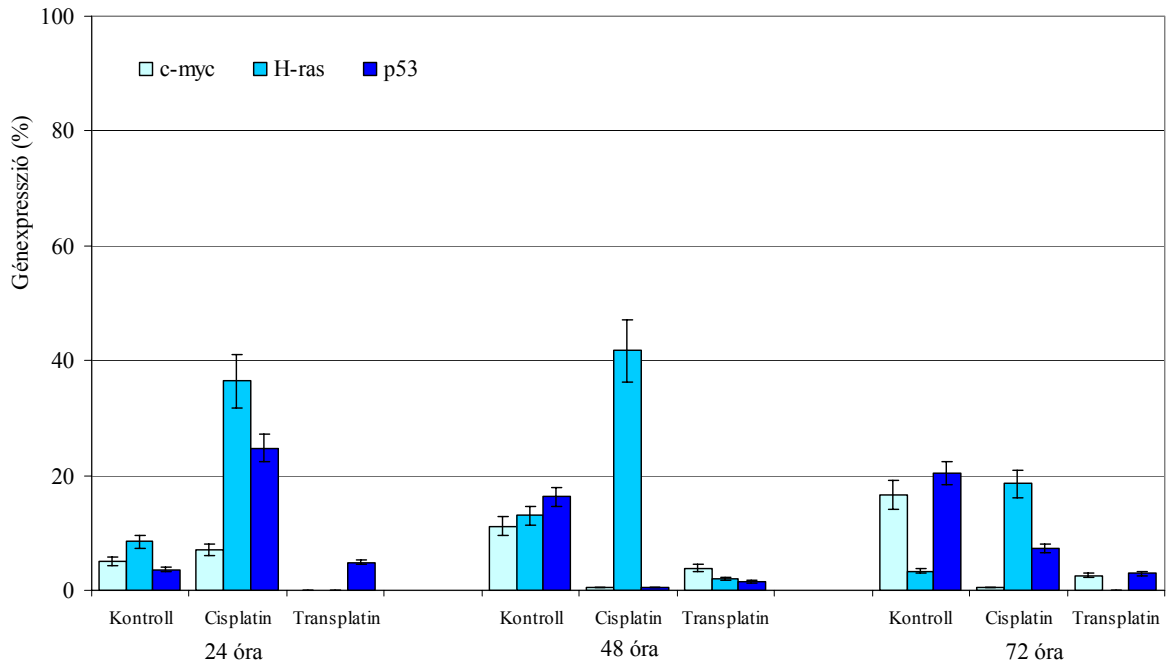


A csontvelőben a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében láttunk emelkedést 24, 48 és 72 óra után is a kontrollhoz képest. A csontvelőben lévő heterogén sejtpopuláció miatt ezek az eredmények óvatosan értékelhetők. A nyirokcsomók vizsgálata esetén a *Ha-ras* gén szignifikáns overexpresszióját láttuk 48 óra után.

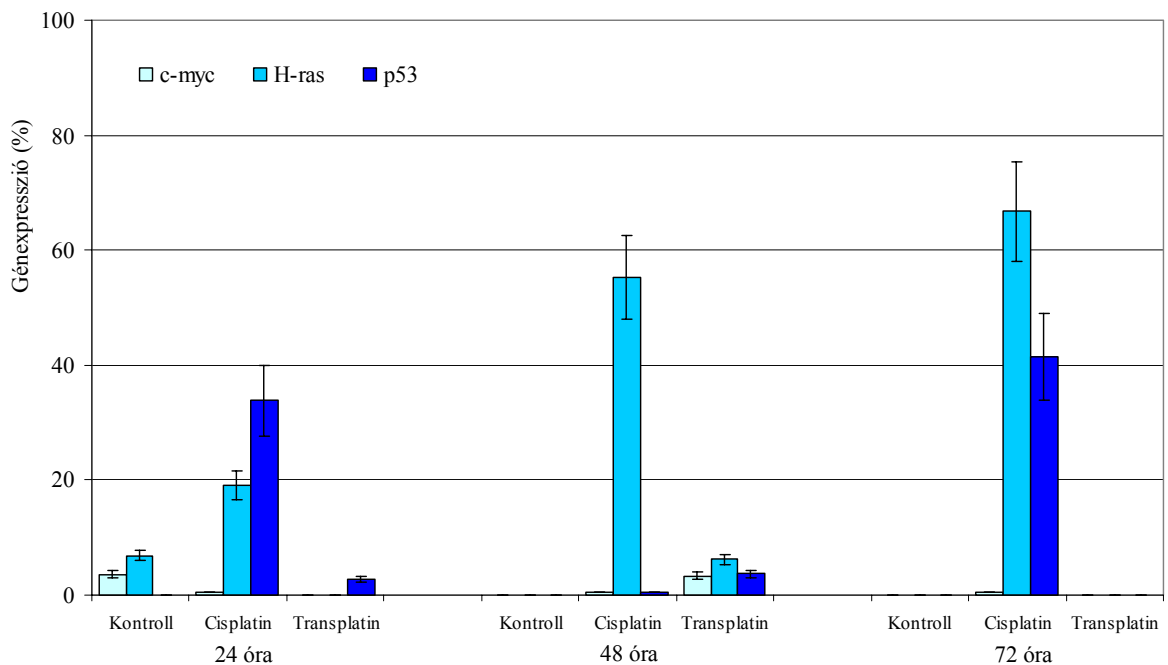
Modellünk alkalmas volt rövid idő elteltével, a változások detektálására. A *Cisplatin* jelentősen, szignifikánsan emelte az onkogének és szuppresszor gén expresszióját a nyirokcsomókban és a csontvelőben a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében. ( $p < 0,05$ ) Az irodalomból ismert mutagenitás tükrében, a *Cisplatin* karcinogenitása felvethető, de ennek hátterében nem biztos, hogy csak a *Cisplatin* mutagenitása áll (52). (10,11. ábra)

### **5/c. A *Transplatin* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata**

Testömeg ekvivalens *Transplatin* (0.66mg./1.ml.i.p.) intraperitoneális adagolása után 24, 48 és 72 órával vizsgáltuk a lépben, a májban, a tüdőben, a vesékben, a nyirokcsomókban, a tímuszban és a csontvelőben a génexpresszió változását a *Cisplatin* csoporthoz és a kontroll csoporthoz képest. A *Cisplatin*nal ellentétben a szintén mutagén *Transplatin* (55) nem okozott szignifikáns változást a CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzseken vizsgált három gén, a *Ha-ras*, a *c-myc* és a *p53* tekintetében. Egyik szervben sem láttuk azokat a hatásokat, melyet a *Cisplatin* esetében tapasztaltunk. Ellentétben a *Cisplatin*nal nem sikerült a *Transplatin* mutagenitása és az esetleges karcinogenitás (génexpresszió) között összefüggést találni (12,13. ábra)( $p < 0,05$ ).



**12. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egér nyirokcsomóban meghatározott géneexpressziós mintázat, *Transplatin* kezelés után 24, 48 és 72 órával**

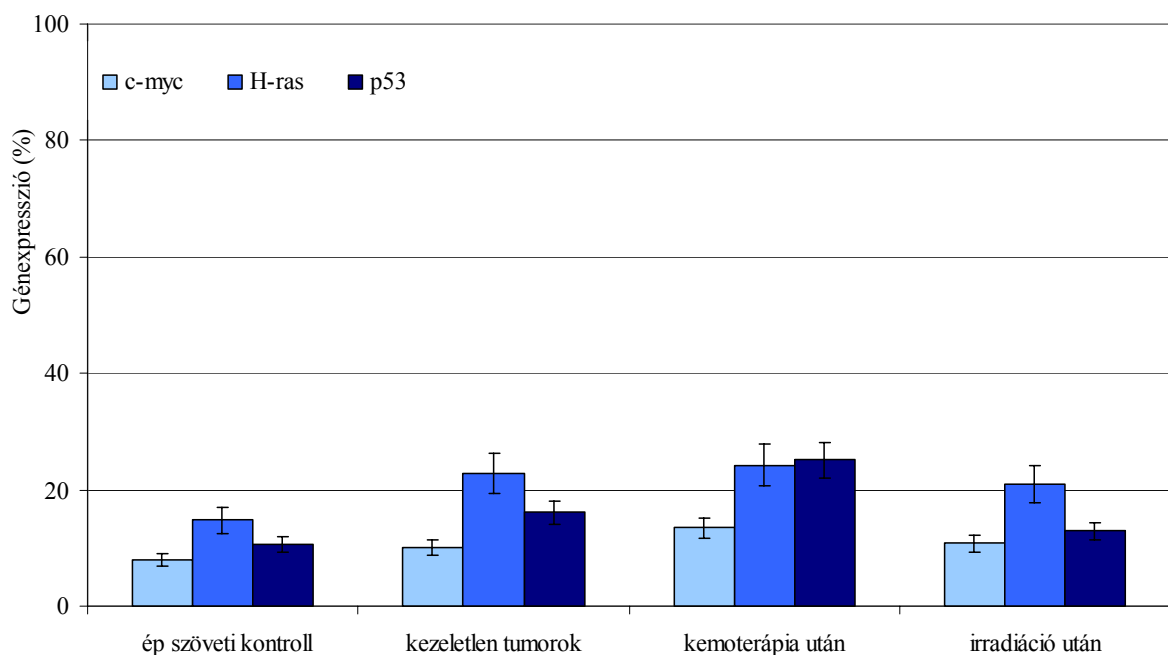


**13. ábra. CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egér csontvelőben meghatározott géneexpressziós mintázat, *Transplatin* kezelés után 24, 48 és 72 órával**

## 5/d. Humán vizsgálatok kezelt és kezeletlen tumoros betegeken

Az ép szöveti kontrollhoz képest, minden csoportban emelkedett génexpressziós értékeket találtunk, mind a *c-myc*, mind a *Ha-ras* és a *p53* gén tekintetében is. A kezeletlen tumoros betegek esetében talált értékek megfelelnek a régóta ismert vizsgálati eredményeknek, így a daganatos megbetegedések által okozott onko/szuppresszor génexpresszió emelkedés itt is nyomon követhető (biomarker). A teszt rendszerünk alkalmas volt a változások detektálására; szignifikáns génexpresszió emelkedés volt látható *Ha-ras* és a *p53* gén vizsgálatakor. A kemoterápia után látható expresszió változás is szignifikáns emelkedés volt az egészséges kontrollokhoz hasonlítva. A génexpresszió emelkedés látható volt a citosztatikus kezelés után a kezeletlen tumorszöveti értékekhez képest is, de szignifikáns emelkedés csak a *p53* tekintetében volt a kezeletlen tumorokhoz képest. A sugárterápia is megváltoztatta az onkogének és a szuppresszor gén aktivitását, bár a kezeletlen tumoros esetekehez képest némileg csökkentette a *p53* expresszióját.

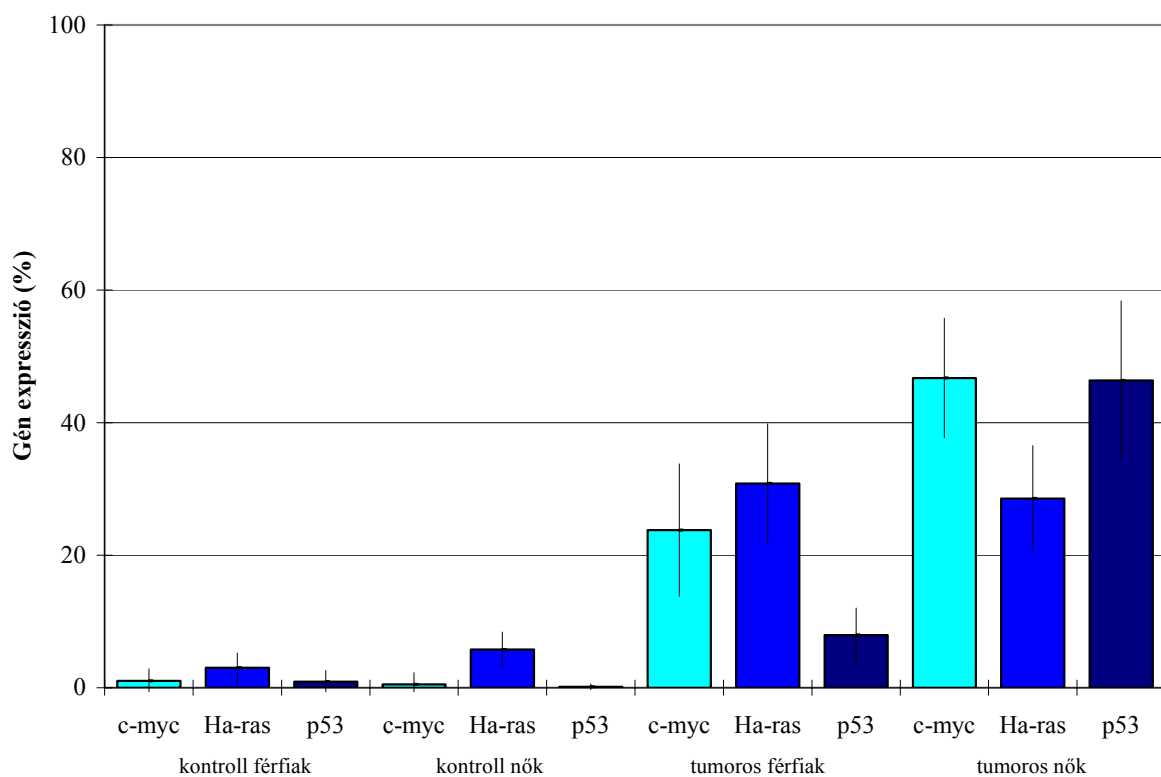
Eredményeink alapján látható volt, hogy a vártak megfelelően alakult a vizsgált gének expressziója a kezeletlen tumorszövet vizsgálata után. A sugárterápia után némileg csökkent a génexpresszió, de nem szignifikáns változást láttunk a kezeletlen tumorokhoz képest. Ezzel szemben a citosztatikus kezelés emelte a génexpressziót (14. ábra). ( $p < 0.05$ )



14. ábra. Génexpressziós mintázat vizsgálata humán mintákon

## 5/e. Génexpresszió vizsgálata perifériás fehérvérsejtekből. Új biomarker kifejlesztése perifériás vérből a veszélyeztettség megállapítására

Minden beteg szövettanilag igazolt (HE festés prex. után) laphám karcinómában szenvedett. 20 ml vérminta került beküldésre, melyek 45 gége-tumoros páciensből származtak (30 ffi. és 15 nő, átlagéletkor:  $56.2 \pm 6.2$  év). Nevezettek nem részesültek még preoperatív kemoterápiában. A kontroll csoport 36 egészséges, nemdohányzó és nem alkoholizáló személyből származott. Látható volt, hogy szignifikáns expresszió emelkedés volt minkét nem tekintetében az egészséges kontrollhoz képest. A 15. ábrán látható a vizsgált három gén, és a felállított csoportok. A daganatos megbetegedésben szenvedők, mind a nők, mind a férfiak esetében emelkedett expressziós értékeket találtunk. A nők esetén a génexpresszió emelkedés magasabbnak imponált a férfi betegek értékeinél is, de csak a p53 esetén volt szignifikáns ez az eltérés. Minden vizsgált gén esetén a kontrollhoz képest szignifikáns volt a daganatos betegekből származó mintákban mért onko/szuppresszor gén expresszió ( $p < 0.001$ ).



15. ábra. Génexpressziós mintázat vizsgálata perifériás vérből izolált mRNS alapján.

## 6. Megbeszélés

Régóta ismertek azok a magyarországi halálozási adatok, melyek alapján riasztó képet kapunk az oro-faringeális daganatos halálozásról, mely nemcsak abszolút értékben növekszik, de a tendencia is emelkedő trendet mutat (21,48,64). A szövettanilag kiérett karcinóma jól kezelhető kemoterápiás és sebészi eszközökkel (23,24). Ismertek azok a külső faktorok (dohányzás, alkoholfogyasztás) is, amelyek elősegítik a tumoros folyamatok kialakulását, és az oro-faciális folyamatok egyszerűen és nem invazíven szűrhetők. Fentiek ellenére nem javult a helyzet az elmúlt évtizedekben. Az oro-faringeális tumoros megbetegedések statisztikai adatai és saját klinikai tapasztalataink indítottak bennünket arra, hogy vizsgálatokat kezdjünk, amely a fej-nyaki daganatok ellátásának relatív inszufficienciája miatt. A platina készítmények használata után tapasztalt recidíva és/vagy második primer tumor szám növekedés irányította figyelmünket a vegyületcsoportra (23,51). Intézetünkben régóta folyik a kemoterápiás szerek mellékhatásainak, főleg karcinogén hatásának vizsgálata. Ismert a *Cyclophosphamid* esete, mely hasonlóan a *Cisplatinhoz* alkilező szer, amely során fény derült az általánosan, így fej-nyaki tumorok hosszútávú palliatív kezelésére is használt kemoterapeutikum, második primer tumort okozó hatására is (hólyag karcinóma)(2,31,56). A *Cisplatin* erősen mutagén, sőt egyes mutagenitási kísérletben a *Cisplatin* egységként, kontrollként szerepel. A mutagenitás és a karcinogenitás közötti 90 %-os koincidencia indított bennünket a platina készítmény vizsgálatára (52). Célunk volt olyan tesztrendszer összeállítása, melynek segítségével képesek vagyunk jelezni a kémiai karcinogén hatás bekövetkeztét, különösen annak figyelembe vételével, hogy ismert a behatás időpontja. Ezzel összhangban olyan szűrési/rizikóbecslési lehetőség kialakítása, amely alkalmas nagyobb csoportok szűrésére, így adva lehetőséget a veszélyeztetett személyek és célcsoportok kiválasztására.

A tesztrendszer kialakítása során adott volt az Intézetünkben használt kémiai karcinogenezis iránt érzékeny CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzs, melynek segítségével több kemoterápiás protokoll és más karcinogén-gyanús vegyület vizsgálata történt meg (19,56). Az irodalomban felkerestük azokat a géneket, melyeket gyakran említettek az oro-faringeális daganatos megbetegedések és laphám eredetű karcinómák vizsgálata során (9-18,32,44,48). Három fontosabb, számunkra elérhető gént határoztunk meg. Ezek a *Ha-ras*, *c-myc* és a *p53* voltak. A *Ha-ras*(Harvey) a sejtmembránhoz kapcsolódó G-fehérje, melynek pontmutációjának bekövetkezte után állandó proliferációs stimulus keletkezik. A *c-myc* és a *p53* magi transzkripciós faktorok. A *c-myc*

transzlokációja után zavart szenved a transzkripció, így karcinómákban és limfómákban iniciatív faktor lehet (45). A *p53* mutáció és deléciónak régóta ismert sokféle tumorban. Mint szuppresszor gén gátolja a daganat kialakulást a DNS reparáció segítségével, ugyanakkor nemcsak csökkent expressziója fontos, hanem az emelkedett is, mert másik oldalról anti-apoptotikus hatású. Sikerült fentieket éppen történt daganateltávolítás után az ép szélből is igazolni, olyan humán esetekben, ahol a recidíva hajlam igazoltan nagyobb volt (field of cancerization) (32).

- Először kemoterápiás protokollok génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk állatkísérletes modellben, CBA/Ca(H-2<sup>k</sup>) egértörzsön. Klinikai tapasztalataink alapján a magasabb recidíva szám háttérben álló citosztatikus séma kiválasztása volt a cél. A klinikai gyakorlatban (PTE ÁOK Fogászati és Szájsebészeti Klinika) a *BVMM* (*Bleomycin, Vincristin, Metotrexat, Mitolactol*) protokollt használták sikerrel a megelőző években (23,24,53). A citosztatikumok klinikai alkalmazása az irodalmi javaslatok, és a saját terápiás tapasztalataink alapján történt (23,24, 53). A mitolactol gyártása megszűnt, ezért egy másik alkiláló szert kívántunk a séma részévé tenni, így adott és javasolt volt valamely platina készítmény használata. A klinikai felhasználás során az első időszakban primer klinikai regresszió tekintetében sikeresnek tűnő séma ellenére a recidíva szám és a túlélés is negatív irányba változott (23), így *BVM* (*Bleomycin, Vincristin, Metotrexat*) és *CFu* (*Cisplatin és 5-Fluorouracil*) protokoll összehasonlítását kezdtük meg állatkísérletes modellben. Mindkettő elfogadott és a hazai kemoterápiás központok által használt és javasolt kombináció. Intézetünkben korábban számos kemoterápiás protokoll vizsgálatát végeztük el, bizonyítva a módszer alkalmasságát és egyes protokollok génexpresszió (onko/szuppresszor) emelkedést indukáló hatását (56). Vizsgáltuk több, humán terápiában használt protokoll génexpresszió változást indukáló hatását (*CHOP, ABVD, COPP* és *Ciklofoszfamid* stb.)(58,59,60). A *Ciklofoszfamid* esetében bizonyítható volt a karcinogén hatás (31). Összehasonlítottuk a klinikailag épnek tűnő és a környezeti tumoros szövetek génexpressziós mintázatát is (61).

Látható volt, hogy tesztrendszerünk ebben az esetben is sikerrel mutatta ki a kemoterápiás sémák korai hatásait. Rövid-távú kísérletünkben igazoltuk, hogy egyes szervekben a platina-származék tartalmú séma szignifikánsan emelte az onkogén expressziót a BVM protokollhoz képest.

- Az irodalmi adatok alapján ismert mutagenitás és a klinikai adatok alapján a *Cisplatin* állatkísérletes vizsgálatát hajtottuk végre. Igazoltuk,

hogy a tesztrendszer már korán 24,48 és 72 óra után alkalmas a DNS-t ért direkt hatások vizsgálatára. A transzkripció során képződött RNS mennyiségét vizsgáltuk a fent leírt módszerekkel, így határoztuk meg a vizsgált három gén esetében a génextpresszió mértékét. A megemelkedett protokollós értékek háttérében az erősen mutagén *Cisplatin* állhat. Az eredmények és a *Cisplatin* ismert mutagenitásának tükrében felvetettük a *Cisplatin* szerepét a kemoterápia utáni karcinogenezisben, mely recidívák és a második primer(szekunder) tumorok kialakulásához vezethet. (pl. *Cyclophosphamid*)(31).

Miután az eddigi vizsgálatokban követhető volt az egyes citosztatikumok potenciális karcinogén hatása is génszinten (56), logikus volt a gyanított karcinogén és bizonyítottan mutagén alkilező szer, a *Cisplatin* monoterápiás hatásának vizsgálata. A *Cisplatin*nak direkt hatása van a DNS-re, a DNS szintézisét gátolja keresztkötések kialakításával a DNS szálai között. Nem fázis specifikus, hatását a G<sub>0</sub> fázisban is kifejti. A *Cisplatin* mutagenitása jól ismert, a mutagenitás és karcinogenitás közötti koincidencia is arra indított bennünket, hogy megvizsgáljuk a *Cisplatin* szerepét (52).

A *Cisplatin* hatását befolyásoló tényezők közül sejtszinten fontos a *Cisplatin* sejtbe jutásának (uptake) lehetősége. Fontos, hogy a sejtbe jutott *Cisplatin* aktív formában hatását kifejthesse. Ha a DNS adduktokon keresztül kialakulnak a kovalens kötések a szálak között, akkor az apoptotikus hatások összessége a (daganat)sejt pusztulását eredményezi. Sejten belül génszinten ennek megakadályozása többféleképpen lehetséges (51).

#### **VIII. táblázat. A Cisplatin hatására kiváltott apoptotikus szignál esetén jelentkező mechanizmusok Cisplatin rezisztens tumor-sejtekben (Siddik 2003)**

- a p53 funkcióhiány (pl.mutáció)
- csökkent FAS expresszió
- BAX dereguláció
- Bcl-2 funkciónövekedés
- Növekedett DNS repair funkció
- Növekedett tolerancia a DNS sérüléssel szemben
- MAPK dereguláció
- Ha-ras mutáció és overexpresszió
- Her-2/neu overexpresszió
- Mismatch gének defektje

A VIII. táblázatból látható, hogy az általunk fej-nyaki daganatokban igen jellemzőnek ítélt három gén (*c-myc*, *Ha-ras* és *p53*) szerepet játszik nemcsak a daganatok kialakulása során, hanem a *ras* és a *p53* egyes daganatsejtek túlélési mechanizmusaiban is. Fontos tehát, hogy a *Cisplatin* hatására nemcsak apoptotikus hatások indulnak be, hanem egyes más, anti-apoptotikus gének működése fokozódik, és más apoptotikus hatású gének deregulációja is bekövetkezik (51).

- Következőkben feltérképeztük azokat a platina készítményeket, melyeket sikerrel használhatnánk a *Cisplatin* kiváltására. Ezen szerek (*Carboplatin*, *DACH-acetato-Pt*, *Oxaliplatin*, *Transplatin*) közül a *Transplatin* tűnt ígéretesnek, mint a *Cisplatin*hoz legközelebb álló sztereoisomér (55). A *Transplatin* alkilező hatású szer, de nem rendelkezik olyan onkogén expressziót emelő hatással, mint a *Cisplatin* annak ellenére, hogy a *Transplatin* is mutagén. Feltételeztük, hogy ezért a sztereoisomériát is okozó molekuláris részlet felelős. (11. ábra)



**11. ábra. A *Cis-* (bal) and *Transplatin* (jobb) szerkezeti modellje.**

Az a része a molekulának, mely a sztereoanalógiáért felelős esetleg felelős lehet a *Cisplatin* genotoxicitásáért is. A *Cisplatin* esetében felmerül egyéb, epigenetikus hatás lehetősége is. Azt is le kell szögezni azonban, hogy az irodalom jelentős része kérdésessé teszi a *Transplatin* hatékonyságát, mint kemoterápiás szerét, de egy kémiaiilag struktúrájában kissé módosított, hatékony szer, fentiek ismeretében javasolható lenne a *Cisplatin* kiváltására (55).



- Humán vizsgálataink azt célozták, hogy felmérjük a régióból származó oro-faringeális tumoros betegek génexpressziós profilját és összevessük az irodalmi adatokkal. Ezután összehasonlítottuk ezt a profilt, a kezelést követő állapotokkal (citosztatikus- és sugárterápia). A génexpressziót a későbbiekben kockázat azonosításra és kockázat becslésre valamint a kemoterápia által okozott hatások vizsgálatára kívánjuk felhasználni, más géekkel kiegészítve (1,31,56).

Célunk volt három onko/szuppresszor gén expressziójának meghatározása volt fej-nyaki daganatos mintákon, az intézetünkben kifejlesztett teszt-rendszer segítségével. A vizsgált gének a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* voltak. A tanulmányozott csoportok, az egészséges kontroll mellett, minden esetben szövettanilag igazolt (HE festés) oro-faringeális laphámrák esetei voltak. Csoportokat alakítottunk ki és ezeket vizsgáltunk kezeletlen tumoros esetekből, valamint citosztatikus és radioterápia utáni állapotokból. Az ép szöveti kontroll kisnyálmirigy biopszia hámszöveti részének negatív eseteiből származott.

Fontos volt látni, alkalmas-e tesztrendszerünk humán vonatkozásban is. Összevetve az eredményeket látható volt, hogy az általunk vizsgált három gén jelentősen emelkedett a kezeletlen oro-faringeális tumorok eseteiben a kontrollhoz viszonyítva, tehát alkalmas biomarkerként az állapot rögzítésre. A kemoterápia utáni állapot (*BVMC/Bleomycin*, *Vincristin*, *Metotrexát*, *Cisplatin*) emelkedett génexpressziót mutat még a kezeletlen állapotokhoz képest is. A sugárterápia is fokozta az onkogének és a szuppresszor gén aktivitást, bár a kezeletlen tumorok adataihoz hasonlítva némileg csökkentette a *p53* expresszióját az irodalmi adatokkal szemben (45). Fentiek és monoterápiás kísérleteink ismeretében valószínűsíthető tehát, hogy a *Cisplatin* jelentős szereppel bír a génexpresszió emelkedésében. Tisztázni kell továbbá a *Cisplatin* szerepét a fentiekben felvetett rövid-távú eredmények után hosszú-távú kísérletben is. Emellett kijelenthető, hogy tesztrendszerünk alkalmas volt a fenti vizsgálatok elvégzésére, és adaptálva és egyszerűsítve a módszert (mintavétel módja), alkalmas lehet szűrővizsgálatokra/rizikóbecslésre nagyobb populáció illetve beteganyag esetén is. Lehetséges továbbá a terápia hatékonyságának megítélése és a kialakult megbetegedés esetén a jobb predikció is.

A génexpresszió emelkedés mind három gén tekintetében látható volt a citosztatikus kezelés után a kezeletlen tumorszöveti értékekhez képest is, de szignifikáns emelkedés csak a *p53* esetén volt a kezeletlen tumorokhoz képest. Más malignus folyamatokban (pl. leukémiák), a génexpresszió változást, mint biomarkert használva, a citosztatikus kezelés után az onko/szuppresszor génexpresszió csökkenés látható, mely használható a „minimal residual disease” követésére, monitorozására. Esetünkben a génexpresszió fokozódás megfelelhet az

emelkedett lokális recidíva számnak. További tisztázandó kérdés, hogy a citosztatikus kezelés mely eleme felel a változásokért. A magasabb recidívaszám hátterének feltárásakor fontos, hogy azokat a terápiás elemeket, melyeket gyanúsítunk, ki kell zárni a kezelésekből, de ennek tisztázása további hosszú-távú vizsgálatok feladata.

- Megelőző vizsgálataink invazív vizsgálmódszere mellett érdeklődésünk egy kevésbé invazív, Intézetünkben kidolgozott és sikerrel alkalmazott módszer felé fordult (57). Megvizsgáltuk gége-tumoros beteganyagon a perifériás vérből izolált fehérvérsejteket génexpressziós tesztrendszerünk segítségével. Megelőző vizsgálataink mutatták, hogy a génexpressziós vizsgálatok használhatóak biomarkerekként(56-60). Látható volt előzetes kísérleteink alapján, hogy ezek a markerek tumoros esetekben izolálhatók a perifériás fehérvérsejtekből is (57). Ennek alapján indítottuk a vizsgálat sorozatot, amely humán, minimál invazív, szűrésre is alkalmas módszert hivatott megvizsgálni. A páciensek véréből fehérvérsejteket szeparáltunk, melyeket a tumorhoz képest egészséges környező szöveteknek tekintettünk („surrounding tissue”). Azokból RNS-t izolálva génexpresszió változásokat mértük. Más vizsgálatokban láttuk, hogy kémiai karcinogén hatására emberben ezek az onko/szuppresszor onko/szuppresszor génexpressziók szignifikánsan emelkedtek (57). Állatkísérletben bizonyítottuk a génexpresszió változás szerepét és használhatóságát a kémiai karcinogenezissel összefüggésben (5). Továbbá láttuk, hogy tumoros manifesztáció nélkül is emelkedhet az onkogénexpresszió az exponált populációban (61). A fehérvérsejtekből mért magasabb onkogén aktiváció származhat a tumor-sejtekből, illetve a kémiai karcinogén által okozott expozíció következményeként. Ismereteink szerint ez volt az első vizsgálat, melynek célja gége-tumoros beteganyag fehérvérsejtjeinek ilyen jellegű vizsgálata volt. A fent említett gének *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* igen fontos szerepet játszanak a fej-nyaki laphám eredetű folyamatok kialakulásában (32). Ismert a *Ha-ras*, *p53* és a *c-myc* szerepe az iniciációban és az anti-apototikus folyamatokban. Következésképp használatuk informatív lehet, bár nem specifikusak, a rizikó-csoportok azonosításában, a terápia hatékonyságának megítélésében, a recidíva hajlam előrejelzésében és a predikció egyéb területein is. További tanulmányok kellenek a génstátusz, az individuális anamnézis és a karcinogén expozíció közötti pontos kapcsolat feltárásához. Ha sikerül az összefüggést bizonyítani, lehetséges a célcsoport azonosítása és a rizikóbecslés. Véleményünk szerint a fenti három gén expresszió vizsgálata része lenne a később kialakítandó szűrésre alkalmas „kitnek” is, mely minimális invazivitással használható.

Alkalmasnak látjuk a módszert a második primer (szekunder) tumorok prevenciójára is, mert olyan módszer van a kezünkben, mely rövid időn belül jelzi az expozíciót és segít kiválasztani a fokozottan veszélyeztetetteket. Fontos feladat tehát ezeket a módszereket a gyakorlatba átültetni, és szerephez juttatni a daganat megelőzésben.

## **7. Összefoglalás**

Fenti vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy szükséges és összeállítható olyan in vivo „short-term” tesztrendszer, mely más, irodalmilag igazolt génekkel kiegészítve alkalmas lehet a szűrésre és a kockázatbecslésre használható módszer kifejlesztésében. Ez utóbbi módszer a primer prevenció eszköztárába tarozik, más, ide tartozó módszerekkel együtt (szekunder prevenció-szűrés) lehetőséget ad a gyakorló orvos számára (házi orvos, fogorvos) a veszélyeztetett populáció meghatározására és ezzel együtt a fatális megbetegedések megelőzésére. A klinikai gyakorlatban a módszer alkalmas lehet a szekunder és terciér prevenció részeként is, nem diagnosztikusan, a betegség kimenetelének vizsgálatára (terciér prevenció), a kezelés (kemoterápia) hatékonyságának és más nem kívánt, esetleges karcinogén hatás vizsgálatára és a második primer (szekunder) tumorok megelőzésére (primer prevenció).

## 8. Új tudományos megállapítások a dolgozatban

1. A *CFu* (*Cisplatin/5-Fluoro-Uracil*) protokoll fokozottan emelte az onko/szuppresszor gének expresszióját *BVM* (*Bleomycin/Vincristin/Metotrexát*) protokollal összehasonlítva.
2. A *Cisplatin* szignifikánsan fokozta az onko/szuppresszor gének expresszióját „short-term” vizsgálat során a kontrollhoz képest.
3. A *Transplatin* nem emelte szignifikánsan a génexpressziót a kontrollhoz képest és szignifikánsan kevésbé emelte onko/szuppresszor gének expresszióját a *Cisplatin*nal összehasonlítva.
4. Láthatóak voltak malignus folyamatban szenvedő betegek emelkedett génexpressziós értékei az egészségesekhez képest. Az általunk használt tesztrendszerben az onko/szuppresszor gének expressziója jelezte az aktivitás fokozódását a *Cisplatin*nal kiegészített protokoll (*BVMC Bleomycin/Vincristin/Metotrexát/ Cisplatin*) használata esetén, még a kezeletlen tumoros mintákhoz képest is, míg a radioterápiában részesült betegeknél ez csökkent a kezeletlen tumoros betegek expressziós értékeihez képest.
5. A gége-tumoros betegek esetében perifériás vérből származó fehérvérsejtekből sikerült az onko/szuppresszor gének expresszióját, mint biomarkert alkalmazni, új minimál invazív módszerrel.
6. Látható, hogy az általunk használt onko/szuppresszor gének expresszió változása alkalmas biomarker a szekunder tumorok prevenciójában, a terápia hatékonyságának monitorozásában.

## 9. Felhasznált irodalom

1. Ember I. Daganatepidemiológia, daganatprevenció. Az onkológia alapjai  
**Medicina Kiadó, Budapest 1-54(1997)**
2. Ember I. és Kiss I. Daganatok és daganat megelőző állapotok molekuláris epidemiológiája  
**Medicina Kiadó, Budapest(2005)**
3. Ember I. and Kiss I. In vivo oncogene expression changes due to environmental carcinogens. **International Conference on Experimental and Clinical Oncology, Island of Kos, Greece, October 3-5,(1996)**
4. Ember I, Kiss I, Gombkötő G, Müller É, Szeremi M: Oncogene and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure. **Cancer Det Prev 22(3):241-5(1998)**
5. Ember I, Kiss I, Málóvics I: Oncogene and tumour suppressor gene expression changes in persons exposed to ethylene oxide. **Eur J Cancer Prev 7(2):167-8(1998)**
6. Sheng Z., Barrois M., Klijanienko J., Micheau C., Richard J.M. and Riou, G. Analysis of the H-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression of lymph node metastases of human head and neck carcinomas. **Br J Cancer 62:398-404(1990)**
7. Saranath D., Chang S.E., Bhoite R.G., Panchal R.G., Kerr I.B., Mehta A.R., Johnson N.W. and Deo M.G. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in tobacco-related human oral carcinoma in India. **Br J Cancer 63:573-8(1991)**
8. Murti P.R., Warnakulasuriya K., Johnson N. W., Bhonsle R.B., Gupta P.C., Daftary D.K. and Mehta F.S. p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. **J Pathol Med 27:191-6(1998)**
9. Gasco M. and Crook T. The p53 network in head and neck cancer. Review. **Oral Oncol 39:222-231(2003)**
10. Field J.K., Lamothe A. and Spandidos, D.A. Clinical relevance of oncogene expression in head and neck tumours. **Anticancer Res 6:595-600(1986)**
11. Meritt W.D., Weissler M.C. and Turk, B.F., Gilmer, T.M. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116:1394-8(1990)**
12. Friedman W.H., Rosenblum B.N., Loewenstein P., Thornton H., Katsatonis G. and Green M. Oncogenes: their presence and significance in squamous cell cancer of head and neck. **Laryngoscope 95:313-6(1985).**
13. de Rosa I., Staibano S., Lo Muzio L., Delfino M., Lucariello A., Coppola A., De Rosa G. and Cully, C. Potentially malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. **J oral Pathol Med 28:252-8(1999)**

14. Waitzberg F.L., Nonogaki S., Nishimoto I., Kowalski L.P., Miguel R., Brentani R.R. and Brentani M.M. Clinical significance of c-myc and p53 expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Canc Det Prev 28:178-186(2004)**
15. Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyama, N. et al. Similarity of protein encoded by human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. **Nature 219:230-4(1986)**
16. Ekberg T., Nestor M., Engstrom M., Nordgren H., Wester K., Carlsson J. and Anniko M. Expression of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in metastatic squamous cell carcinomas of the oral cavity and base of tongue. **Int J Oncol 26:1177-1185(2005)**
17. Arora S., Matta A., Shukla N.K., Deo S.V.S. and Ralhan R. Identification of Differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. **Molec Carcinogen 42:97-108(2005)**
18. Serewko-Auret M.M., Dahler A.L., Smith L., Wong C.F., Popa C., Barnes L.M., Coman W. and Saunders N.A. Alterations in gene expression associated with head and neck carcinoma development. **Canc Gen Prot 1:137-148(2004)**
19. Ember I, Nowrasteh G, Kiss I: Different H-2 complexes given altered susceptibility for chemical carcinogen induced oncogene expression. **Anticancer Research 19: 1181-1186(1996)**
20. Ember I. A fej-nyaki daganatok komplex diagnosztikája és terápiája. **Gyulai onkológiai napok kiadványa (1995)**
21. Bánóczy J., Bakó A., Dombi Cs., Ember I., Kósa Zs., Sándor J. és Szabó Gy. Stomato-onkológiai szűrővizsgálatok: a korai diagnosztika lehetőségei **Magyar Onkológia 45:143-8(2001)**
22. Mehotra R., Vasstrand N.E. and Ibrahim O.S. Recent advances in understanding carcinogenicity of oral squamous cell carcinoma: From basic molecular biology to latest genomic and proteomic findings. **Canc Gen Prot 1:283-294(2004)**
23. Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.** and Tornóczky T. A randomized study of cisplatin-combined chemotherapy protocol. **Can Det Prev 24(Suppl-1)s-248(2000)**
24. Olasz L., Kwashie F. and Herczegh P. A comparative study of preoperative BVMM chemotherapy and irradiation in advanced squamous cell cancer of the oral cavity. **Neoplasma 43:51-6(1996)**
25. Doll R. and Petó R. Mortality in relation to smoking: 20 year observation on male doctors. **Br med J 2:1525-36(1976)**
26. Spandidos D.A. Molecular and cellular oncology (1992) **JAI Press London**
27. Lissowska et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. **Eur J Canc Prev 12:25-33(2003)**

28. Huber M.H. and Hong W.K. Biology and Chemoprevention of Head and Neck Cancer. **Current Problems in Cancer 18: 81-140(1994)**
29. Klein G. and Klein E. Evolution of tumours and their impact on molecular oncology. **Nature 315:190-5(1985)**
30. Knudson, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res 45:1437-43(1985)**
31. Ember I., Kiss I. and Vermes E. Early effect of cyclophosphamide in oncogene activation in vivo. **In vivo 12:201-208(1998)**
32. Csuka O., Olasz J., Juhász A., Hargitai Á., Remenár É. és Kásler M. Genetikai marker-vizsgálatok fej-nyaki daganatokban. **Magyar Onkológia 45:161-167(2001)**
33. Ember, I. Molekuláris epidemiológia In: Preventív és molekuláris onkológia. **Pécs, pp.57-59(1994)**
34. Az onkológia alapjai (tk) Szerk.: Ádány R., Kásler M., Ember I., Kopper L. és Thurzó L. **Medicina 1997**
35. Mizukawa N., Sugiyama K., Fukunaga J., Ueno T., Mishima K., Takagi S. et al. Defensin-1.-a peptid detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. **Ant Canc Res 18:4645-50(1998)**
36. Hirata S., Odajima T., Kohama G., Ishigaki S. and Niitsu Z. Significance of glutathion S-transferase-pi as a tumour marker in patients with oral cancer. **Cancer 70(10):2381(1992)**
37. Nagy B., Tiszlavicz L., Eller J., Molnár J. and Thurzó L. Ki-67, Cyclin D1, p53/Bcl2 expression in advanced head and neck cancer. **In Vivo 17:93-96(2003)**
38. Perjési P., Bayer Zs. and Ember, I. Effect of E-2-(4-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene induced Onco/Suppressor Gene Action in Vivo: A 24 hour Experiment. **Anticancer Res 20:475-82(2000)**
39. Chang KW., Lin SC., Koos S., Pather K., Solt D. P-53 and ha-ras mutations in chemically induced hamster buccal pouch carcinomas. **Carcinogenesis 17:595-600(1996)**
40. Shindoh M., Chiba I., Yasuda M., Saito T., Funaoka K., Kohgo T. et al. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. **Cancer 9:1513-21(1995)**
41. Högmo A., Kuylenstierna J., Lindholm J., Nathanson A., Auer G. and Munck-Winckland E. Nuclear DNA content and p53 overexpression in stage I squamous cell carcinoma of the tongue compared with advanced tongue carcinomas. **Mol Pathol 5:268-72(1998)**

42. Van Heerden W.F.P., Van Rensburg E.J., Hemmer E.J., Raubenheimer E.J. and Engelbrecht S. Correlation between p53 gene mutation, p53 labeling and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas. **Anticancer Research 18:237-40(1998)**
43. Mighell A. Proliferating cell nuclear antigen. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1:3-4(1995)**
44. Kövesi Gy. és Szende B. Cyclin D1, p27 és p63 prognosztikai jelentősége orális leukoplakiában. **Magyar Onkológia 48:309-13(2004)**
45. Remenár É., Koronczay K., Németh Gy., Doleschall Z. és Csuka O. Onkogén fehérjék mennyiségi változásasugárkezelés hatására fej-nyaki laphámrákokban. **Fül-Orr-Gégegyógyászat 43:86-92(1997)**
46. Arora S., Matta A., Shukla N.K., Deo S.V.S. and Ralhan R. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. **Molecular Carcinogenesis 42:97-108 (2005)**
47. Somers K.D. Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. **Oncogene 5:915-20(1990).**
48. Gaudi I. és Kásler M. A rosszindulatú daganatos halálozás változása 1975 és 2001 között Magyarországon. **Magyar Onkológia 46:290-5(2002)**
49. Ember I. and Rády P. A daganatok kemoprevenciójáról **Magyar Onkológia 37/1:64- 8(1993)**
50. A klinikai onkológia kézikönyve Szerk.: Love R.R. **Springer (1995)**
51. Siddik H.Z. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene 22:7265-79(2003)**
52. Sanderson BJ., Ferguson LR., Denny WA. Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. **Mutat Res 355(1-2):59-70(1996)**
53. Olasz L., Szabo I., Horvath A. a combined treatment for advanced oral cavity cancers. **Cancer 62:(7)1267-74(1988)**
54. Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem 162:156-59(1987)**
55. Farrel N: Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of trans geometry. **Met Ions Biol Syst 32:603-39(1996)**
56. Ember I., Raposa T., Varga Cs., Kiss I. Effect of different cyostatic protocols on oncogene expression in CBA/Ca mice. **Anticancer Research 15:1285-88(1995)**
57. Gyöngyi Z., Ember I., Kiss I., and Varga Cs. Changes in expression of onco- and suppressor genes in peripheral leukocytes - as potential biomarkers of chemical carcinogenesis.” **Anticancer Res 21:3377-3380(2001)**



58. Ember I., Kiss I. and Raposa T.: In vivo effects of COPP protocol on onco and suppressor gene expression in a “follow up study” **In vivo 11: 399-402(1997)**
59. Ember I., Kiss I., Nowrasteh G. and Raposa T.: Effects of ABVD therapeutic protocol on oncogene and tumor suppressor gene expression in CBA/Ca mice. **Anticancer Research 18:1149-1152(1998)**
60. Ember I., Kiss I., Raposa T., Nowrasteh G. and Matolcsy A.: In vivo effects of CHOP protocol on onco and expression in “follow up study” **In Vivo 12:489-494(1998)**
61. Kiss I., Dezsényi E., Kiss T., Csécei G., and Ember I. Detection of elevated oncogene expression in brain tumours and their macroscopically healthy surrounding tissues. **Eur J Cancer Prev 7:417-419(1998)**
62. Fej-nyaki daganatok prevenciója és ellátása. Az onkológiai prevenció helyzete **OEP kiadvány Pécs 2003**
63. Ember I., Kiss I. és Sándor J. A daganatok epidemiológiája és prevenciója. **Dialóg Campus Kiadó (2006)**
64. Döbrössy L. A szájüregi daganatok epidemiológiája: a probléma jelentősége. **Magyar Onkológia 45:99-105(2001)**

## 10. Saját publikációk

### 10/1. Az értekezés témaköréhez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

#### Folyóiratban megjelent eredeti (in extenso) közlemények:

1. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z., Tornóczky T. és Királyfalvy L.: Kombinált cisplatin tartalmú kemoterápia randomizált vizsgálata a fej-nyaki régióban lévő planocelluláris rákok kezelésében **Orvosi Hetilap 2000,141(45),13-17.**
2. **Németh Á.** Fej-nyaki daganatok molekuláris és prediktív epidemiológiája **Orvostudományok 2001,4:235-243.**
3. **Németh Á.**, Gyöngyi Z., Nádasi E., Ember Á., Olasz L., Nyárády Z., Skapinyecz J. and Ember I.: Effect of Cisplatin treatment on early activation of oncogenes in vivo. **In Vivo 16:307-310 (2002) imp. f.: 1,115**
4. **Németh Á.**, Nyárády Z., Ember Á., Beró T. és Rodler I. Szekunder tumorok preventiójának lehetőségei I. In vivo kezelés hatása onkogének korai aktivációjára. **Egészségtudomány 2003.47.(91-100).**
5. **Á. Németh**, E. Nádasi, Z. Gyöngyi, L. Olasz, Z. Nyárádi, Á. Ember, A. Kvarda, L. Bújdosó, I. Arany, I. Kiss, A. Csejtey and I. Ember: Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. **Anticancer Research 23:4831-4836 (2003) imp. f.: 1.347**
6. **Németh Á.**, Nádasi E., Beró A., Olasz L., Ember Á., Kvarda A., Bujdosó L., Arany I., Csejtey A., Faluhelyi Zs. and Ember I.: Early effects of Transplatin on oncogene activation in vivo **Anticancer Research 24:3997-4002 (2004) imp. f.: 1.347**
6. Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Királyfalvi L. and Ember I.: Failure of alkylating agents in improving Induction chemotherapy of oropharyngeal squamous cell cancer **Anticancer Research 24:2557-2562 (2004) imp. f.: 1,347**
7. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z., Tornóczky T. and Királyfalvi L. Results and failures with or without Cisplatin containing induction chemotherapy in treatment of squamous cell carcinoma of head and neck. **Cancer Detection Prevention 28(1):65-71(2004) imp. f.: 1,408**
8. Ember I, **Németh Á.**, Varga Cs., Perjési P., Arany I., Fehér K., Németh K., Dombi Zs. and Kiss I.: Molecular epidemiologic markers: A new concept in the preventive medicine with special attention to the prevention of cancer **Central European Journal of Occupational and Environmental Health 11: 3-15(2005)**
9. **Németh Á.**, Szanyi I., Dombi Zs., Csontos Zs., Pytel J., Göbel Gy., Bauer M. and Ember Á.: Elevated gene expression in peripheral leukocytes as a biomarker of pharyngolaryngeal tumour patients **Central European Journal of Occupational and Environmental Health 1:16-20(2005)**

10. **Németh Á.**, Olasz L., Beró A., Pázsit E., Czakó Gy., Nowrasteh G., Varjas T., Dombi Zs. és Csontos Zs.: Gén expresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben **Magyar Epidemiológia (2006)** közlésre elfogadva

**Idézhető absztraktok:**

1. Olasz L., Tóth B., **Németh Á.** and Tornóczky T.: Results and failures of preoperativ BVMM chemotherapy and irradiation in advanced oral cancers. **ISPO Symposium Cancer Det Prev 22(suppl.1)s-118(1998) imp. f.: 1,408**
2. Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Tornóczky T.: A randomized study of cisplatin-combined chemotherapy Protocol **ISPO Symposium Geneva Cancer Det Prev 24(Suppl-1)s-248(2000) imp. f.: 1,408**
3. **Németh Á.**, Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á. and Ember I.: The effect of cisplatin on early oncogene activation in vivo **Anticancer Research 21.No3A(2001) imp.f.: 1,416**
4. Ember I., Faluhelyi Zs., Kiss I., Kvarda A., Bújdósó L., Ember Á., **Németh Á.**, Csejtey A. Nowrasteh G. and Varjas T.: Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer **VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober pp:3479(2004) imp. f.: 1,347**
5. **Németh Á.**, Nyárády Z., Olasz L., Ember Á. and Ember I.: Effects of Transplatin oncogene activation in vivo **VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober pp:3578(2004) imp. f.: 1,347**
6. Olasz L., Kucsár Gy., Nyárády Z., Tornóczky T., **Németh Á.**, Kinczel G., Prantner I: results of neoadjuvant BVM chemotherapy + Culevit tablets for treatment of oropharyngeal cancer **XVII. Congress of the European Assosiation for Cranio-maxillofacial Surgery Tours, France J of Cranio-maxillofacial Surgery, Vol 32, suppl 1., pp229(2004)**
7. **Németh Á.**, Varjas T., Beró A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A Transplatin hatása onkogének korai aktivációjára **MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:pp:67(2005)**
8. **Németh Á.**, Varjas T., Beró A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A génextpresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben **MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)**

9. **Németh Á.**, Nádasi E., Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Kvarda A., Bujdosó L., Arany I., Kiss I., Ember I.: Fej-nyaki daganatok terápiájában használt citosztatikus protokollok hatása onkogének korai aktivációjára állatkísérletben **MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)**
10. Szanyi I., **Németh Á.**, Dombi Zs., Csontos Zs., Göbel Gy., Ember Á.: Az emelkedett onkogén aktiváció, mint biomarker, vizsgálata leukocitákban faringolaringeális tumoros megbetegedésekben **MMPET I. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum, 2:1pp:67(2005)**
11. Ember I., Kiss I., Varga Cs., Varjas T., Nowrasteh G., Nádasi E. and **Németh Á.**: Molecular epidemiological biomarkers in risk assessment of cancer **The 10<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 8<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine 13-15. October, 2005, Hersonissos, Crete, Greece International Journal of Molecular medicine 16:1(2005)**

#### **Kongresszusi előadások:**

1. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z., Tornóczky T.: A Cisplatin randomizált klinikopathológiai vizsgálata **Magyar Kemoterápiás Társaság XIV. Konferenciája (1999)**
2. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z.: Randomized study of cisplatin containing chemotherapy protocol. **Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság III. Nemzeti kongresszusa Hévíz(1999)**
3. **Németh Á.**, Ember I., Olasz L., Nyárády Z.: Fej-nyaki daganatok molekuláris és prediktív epidemiológiája **Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság IV. Kongresszusa Debrecen(2000)**
4. Olasz L., Nyárády Z., **Németh Á.**, Tornóczky T., Királyfalvy L.: Kombinált cisplatin tartalmú kemoterápia randomizált vizsgálata a fej-nyaki régióban lévő planocelluláris rákok kezelésében **Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság IV. Kongresszusa Debrecen (2000)**
5. **Németh Á.**, Nyárády Z., Olasz L., Ember Á., Ember I.: In vivo cisplatin kezelés hatása onko- és szuppresszorgének korai aktivációjára. **45/3(Suppl.-1)286MOT 24. Kongresszusa (2001)**
6. Nyárády Z., **Németh Á.**: Cisplatin tartalmú kemoterápiás protokoll hatása fej-nyaki daganatok molekuláris epidemiológiájára **Fiatalkorú Onkológusok Fóruma Pécs (2001)**
7. **Németh Á.**, Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á. and I. Ember: The effect of Cisplatin on early oncogene activation in vivo (poster) **International Conference on Apoptosis Athén Greece(2001)**

8. Csejtey A., Faluhelyi Zs., Kiss I., Kvarda A., Bujdosó L., **Németh Á. and** Ember I.: Early detection of carcinogen exposures: an animal model using in vivo gene expressions as biomarkers **ISAC XXII International Congress Montpellier France (2004)**
9. Ember I., Kiss I., Varjas T., Nowrasteh G., Bujdosó L., Kvarda A., Faluhelyi Zs., Csejtey A., Ember Á., **Németh Á.**, Pázsit E., Czakó Gy. and Gergely P.: In vivo gene expression system is a good biomarker of chemopreventive agents **16<sup>th</sup> Pezcoller Symposium Trento Italy (2004)**
8. Csejtey A., Faluhelyi Zs., Kiss I., Kvarda A., Bujdosó L., **Németh Á.** and Ember I.: The early detection of carcinogen exposures in an animal model using in vivo genic expressions **18<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research /EACR/ Innsbruck, Austria (2004)**

#### **Könyvfejezetek:**

1. **Németh Á.**, Ember Á., Bujdosó L., Kvarda A.: Fej-nyaki daganatok (152-167.o.)  
In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája Szerk.: Ember I., Kiss I. **Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005**
2. Ember I. és Kiss I.: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája **Németh Á.**, Ember Á., Bujdosó L., Kvarda A.: *Fej-nyaki daganatok c. könyvfejezete* (152-167) **Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest, 2005**

## **Az értekezés témaköréhez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:**

### **Folyóiratban megjelent eredeti közlemények:**

1. Olasz L., **Németh Á.**, Tóth B. and Tóth T. Orocutan és pharyngocutan fistulák műtéti megoldása **Orv Hetil 44:2651-56(1996)**
2. Olasz L., Kwashie F. and **Németh Á.** Closure of an oropharyngo-cutaneous fistula in an irradiated patient (a case report) **Int J Oral Maxillofac Surg 1999;28:364-65. imp. f.: 1,154**
3. Olasz L., **Németh Á.**, Kubatov M., Nyárády Z. Kiterjedt faciális defektusok kettős lebenyes rekonstrukciója **Orv Hetil 141:2079-83(2000)**
4. Olasz L., **Németh Á.**, Nyárády Z. Surgical closures of oropharyngocutaneous fistulas **Plast Reconstr Surg 106:577-82(2000) imp. f.: 1,872**
5. Gyöngyi Z., Grama L., Nádas E., Sándor J., **Németh Á.**, Varga Cs., Kiss I. and Ember I.: Flow cytometric analysis of DMBA-induced early in vivo ras expression. **In Vivo 16:323-326 (2002) imp. f.: 1,115**
6. Sándor J., Szerencse P., Szűcs M., **Németh Á.**, Kiss I., Ember I.: Környezeti eredetű daganatos megbetegedések területi halmozódásainak vizsgálata **Magyar Onkológia 47:(2003)**
7. Sándor J., **Németh Á.**, Kiss I., Kvarda A., Bujdosó L., Ember I.: Kistérségek halálozási viszonyainak változása **Egészségtudomány 47:29-44(2003)**
8. Kiss I., **Németh Á.**, Bogner B., Pajkos G., Orsós Zs., Sándor J., Csejtei A., Faluhelyi Zs., Rodler I. and Ember I.: Polymorphisms of glutathione-s-transferase and arylamine N acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer **Anticancer Research 24:3965-3970 (2004) imp. f.: 1,347**
9. Faluhelyi Zs., **Németh Á.**, Ródlér I., Csejtei A., Kvarda A. and Bujdosó L.: Gene expression changes in peripheral leukocytes of breast cancer patients as a result of CMF treatment **Central European Journal of Occupational and Environmental Health 10:184-88(2004)**

### **Kongresszusi előadások:**

1. Olasz L., Herczegh P., **Németh Á.** : A reconstruction of pharyngocutaneous defect in a preoperatively irradiated patient. **12th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Budapest 109(1995)**

2. **Németh Á., Szabó Gy.:** Az implantológia mindennapos problémái **Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság Dunántúli (Pannon) Szekció Első Szimpóziuma (1998)**
3. Szabó J., **Németh Á.,** Watts A. : Gyökértömő sealer-ek állatkísérletes vizsgálata **Magyar Fogorvosok XV. "Árkövy" kongresszusa (1998)**
4. Olasz L., **Németh Á.,** Nyárády Z.: Platysma musculocutaneous flap in the head and neck region. **Magyar Arc-, Állcsont és Szájsebészeti Társaság III. Nemzeti kongresszusa (1999)**
5. Kiss I., Bogner B., Csejtey A., Faluhelyi Zs., **Németh Á.,** Sándor J., Orsós Zs, Pajkos G. and Ember I.: Interaction between alleles of low penetrance genes in determining individual susceptibility to colorectal cancer **18<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research /EACR/ Innsbruck Austria (2004)**
6. Ember Á., **Németh Á.,** Varga Cs., Faluhelyi Zs., Csejtey A., Iványi J., Kiss I. Ghodrattollah N., Fehér K., Kékes N., Dombi Zs., Arany I. and Ember I.: Investigation on the expression of onco/suppressor genes as predictive biomarkers for breast cancer patients **VII. International Conference of Anticancer Research Corfu Greece (2004) Vol.24, Number 5D(2004) pp:3479 imp. f.: 1,347**
7. Zs. Faluhelyi, Á. Ember, R. Schnabel, I. Rödler, Gy. Czakó, E. Pázsit, **Á. Németh,** J.L. Iványi, Zs. Dombi, A. Kvarda, L. Bujdosó, A. Csejtey, A. Sebestyén, I. Boncz, I. Ember: CMF protocol has an effect on onco/suppressor gene expression - in vivo **VII. International Conference of Anticancer Research Corfu, Greece October 25-30, 2004 Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3483 imp. f.: 1,347**
8. Kiss I., Orsós Zs., Csejtey A., Schnabel R., Faluhelyi Zs., Bogner B., Sándor J., **Németh Á.** and Ember I.: Allelic Polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer **VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu Anticancer Research Vol.24, Number 5D(2004) pp:3536 imp. f.: 1,347**
9. Molnár T., Kiss I., Faluhelyi Zs., Csejtey A., Kvarda A., Bujdosó L., **Németh Á.,** Pázsit E. and Ember I.: Expression of onco/tumor suppressor genes in lung cancer patients **VII. International Conference of Anticancer Research Corfu Greece(2004)**
10. Nyárády Z., **Németh Á.,** Bán Á., Ember I. and Olasz L.: Relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in head and neck cancer **VII. International Conference of Anticancer Research Corfu Greece(2004)**
11. Schnabel R., Varga P., Kiss I., Ember I., Varga Cs., **Németh Á.** and Iványi J.: Epidemiological investigation of patients with colorectal polyps **VII. International Conference of Anticancer Research Corfu Greece Anticancer Research Vol.24, Number 5D(2004) pp:3623 imp. f.: 1,347**
12. Nyárády Z., **Németh Á.,** Mukics a., Olasz I. Relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (salagen) during irradiation in head and neck cancer **XVII. Congress of the European Assosiation for Cranio-maxillofacial Surgery Tours France J of Cranio-maxillofacial Surgery 32:suppl.1pp230(2004)**

14. Nyárády Z., **Németh Á.**, Bán Á., Ember I. and Olasz L.: Relieving symptoms of xerostomia with oral pilocarpine (Salagen) during irradiation in Head and Neck Cancer  
**17<sup>th</sup> International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Vienna, Austria (2005)**
16. Nyárády Z., Mandel I., Orsi E., Róthy Á., **Németh Á.**, Olasz L.: Felszívódó implantátumok traumatológiai alkalmazása arc-állcsontsebészetben **Magyar Arc, Állcsont és Szájsebészeti Társaság IX.Nemzeti Kongresszusa (2005) Hévíz**
17. Nyárády Z., **Németh Á.**, Mukics A., Szentirmay M., Bán Á., Rónai A., Olasz L.: Sugárterápia alatt kialakuló szájszárazság (xerostomia) tüneteinek enyhítése pilokarpin tartalmú gyógyszerrel **Magyar Arc, Állcsont és Szájsebészeti Társaság IX.Nemzeti Kongresszusa (2005) Hévíz**



## Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm Feleségemnek, Édesanyámnak és Gyermekeimnek, hogy támogattak.

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a dolgozat elkészítéséhez hozzájárultak a Pécsi Tudományegyetem Humán Közegészségtani Intézetében és más Intézetekben.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Ember Istvánnak, hogy kezdettől fogva támogatta és segítette munkámat.

Külön köszönetet mondok Dr. Kiss Istvánnak, Prof. Dr. Beró Tamásnak, Dr. Olasz Lajosnak, Dr. Nyárády Zoltánnak, Dr. Nádasi Editnek, Varjas Tímeának, Szabolcsi Péternek, Herczeg Mónikának, Brunnerné Bayer Zsuzsának, Fóris Máriának, Dr. Varga Csabának, Orsós Zsuzsának hogy munkájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy a dolgozat elkészülhessen és dr. Arany Istvánnak a *Transplatin* vizsgálatában nyújtott segítségével.

Külön köszönetet mondok Teply Tamásnak a feltételek megteremtésében nyújtott támogatásáért.

## In Memoriam

A dolgozat elkészültével megemlékezem édesapámról, Prof. Dr. Németh Árpádról, aki a Patológia és az Igazságügyi Orvostan tudósaként, és emberként elindított nemcsak a fiziológia iránti érdeklődés útján, hanem olyan morális alapokat adott, melyek nap mint nap segítenek, hogy teljes életet élhessek.