

***Biomarkerek alkalmazása az emlőrák-prevenció  
különböző szintjein***

***Dr. Faluhelyi Zsolt***

***Programvezető: Dr. Ember István***

***Témavezető: Dr. Kiss István***

***Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Népegészségtani Intézet***

***Pécs, 2007.***

# *Tartalomjegyzék*

<b>I. Bevezetés.....</b>	<b>3. oldal</b>
I.1. Az emlőrák epidemiológiája és molekuláris epidemiológiája.....	3. oldal
I.2. A prevenció szerepe.....	15. oldal
<b>II. Célkitűzések.....</b>	<b>20. oldal</b>
<b><u>III. Anyag és módszer.....</u></b>	<b>21. oldal</b>
III.1. Polimorfizmus vizsgálatok.....	21. oldal
III.2. Génexpresszió-változások vizsgálata.....	26. oldal
III.3. Statisztikai módszerek.....	27. oldal
<b><u>IV. Eredmények.....</u></b>	<b>28. oldal</b>
IV.1. Polimorfizmus vizsgálatok.....	28. oldal
IV.2. Génexpresszió-változások vizsgálatai.....	33. oldal
<b><u>V. Megbeszélés.....</u></b>	<b>36. oldal</b>
<b><u>VI. Új eredmények.....</u></b>	<b>40. oldal</b>
<b><u>VII. Irodalom.....</u></b>	<b>53. oldal</b>
<b><u>Saját közlemények.....</u></b>	<b>45. oldal</b>
<b><u>Köszönetnyilvánítás.....</u></b>	<b>70. oldal</b>

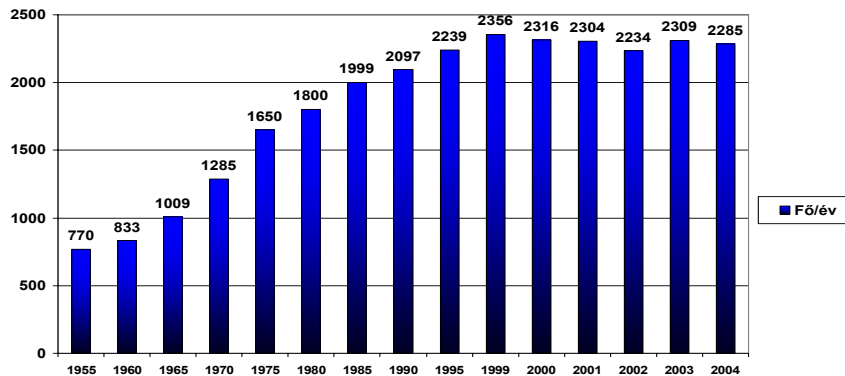
# ***I. BEVEZETÉS***

## **I.1. Az emlőrák epidemiológiája és molekuláris epidemiológiája**

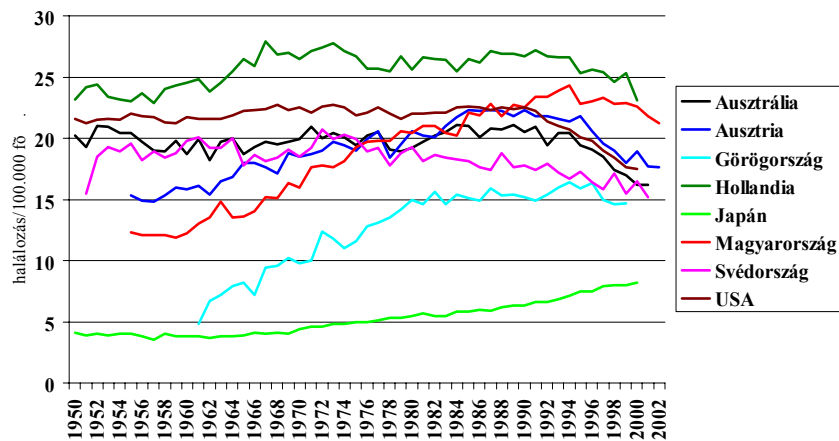
Magyarországon 2005-ben 14.956 nő halt meg daganatban, ezen halálozásoknak 15,3%-áért az emlőrák volt a felelős. Az Amerikai Egyesült Államokban és Nyugat-Európában is az emlőrák a második a daganatos halálozások között. Az Amerikai Rákkutató Társaság becslése szerint 1:9 az esély arra, hogy egy nő élete során emlőrákban betegedjen meg. Egy amerikai vizsgálat szerint 1930-tól kezdve az emlőrák korszpecifikus halálozási rátája közel konstans értéket mutatott Amerikában, míg az incidencia 1980 és 1987 között 32%-kal emelkedett. A 80-as években a postmenopauzában lévő nők körében emelkedett az incidencia, a 90-es években viszont a premenopausában lévő nőkben lett gyakoribb az emlőrák (Ries, 1990). Nyugat-Európában az emlőrák incidencia az életkorral arányosan emelkedik, de a növekedés mértéke gyorsabb 50 éves kor előtt, mint az után.

### **Az emlőrák mortalitása, morbititása**

Magyarországon az elmúlt 50 évben az emlőrákos mortalitás 2001-ig az első helyen állt a női daganatos halálokok között. 2002-ben a tüdőrákos halálozás utolérte és megelőzte az emlőrákot, de sajnálatos módon ez csak azt jelenti, hogy a tüdőrákos halálozás növekszik, nem pedig azt, hogy az emlőrákos mortalitás csökkenne (1. ábra, Demográfiai Évkönyv, 2004). A magyarországi daganatos halálozási tendencia egyébként hasonló a többi fejlett országokéhoz (2. ábra), de standardizált arányaiban jóval magasabb!



1. ábra: Az emlőrák mortalitása, Magyarország. 1950-2004.



2. ábra: Néhány ország emlőrákos mortalitása

Az emlőrák incidenciája a többi daganatos megbetegedéshez hasonlóan szintén emelkedő tendenciát mutatott az elmúlt évtizedekben. Míg a női daganatos halálozások tekintetében 2001-ben az emlőrák a második helyre került, addig az daganatincidencia tekintetében magasan vezet az emlőrák (I. táblázat), (Ottó, 2005). Dacára az elmúlt évek óriási erőfeszítéseinek (Kásler, 2000), egyelőre nem sikerült látványos eredményt elérni az emlőrákos mortalitás csökkentésében.

Lokalizáció		Esetszám				
		2001	2002	2003	2004	2005
1.	<b>Emlő (C50)</b>	<b>7 152</b>	<b>8 271</b>	<b>8 188</b>	<b>7 546</b>	<b>7 553</b>
2.	Bőr egyéb* (C44)	5052	5281	5291	5450	6046
3.	Kolorektális (C18-C21)	4295	4120	4107	4136	4203
4.	Tüdő (C33-C34)	3752	3649	3543	3422	3556
5.	Nyirok- és vérképzőr. (C81-C95)	1795	1547	1620	1689	1728
6.	Méhtest (C54-55)	1375	1235	1258	1283	1289
7.	Petefészek(C56)	1329	1323	1215	1202	1271
8.	Méhnyak (C53)	1422	1211	1230	1188	1098
9.	Gyomor (C16)	1106	1018	978	1129	1028
10.	Vese (C64-C66, C68)	912	926	963	972	908
	<b>Összesen</b>	<b>37674</b>	<b>38143</b>	<b>37840</b>	<b>37461</b>	<b>38440</b>

I. táblázat: A 2000-2005-ben bejelentett új daganatos esetek a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján, nők.

Az emlőrák incidenciájában jelentős különbségekkel találkozhatunk az egyes etnikumok között is. Bowen és munkatársai például leírják, hogy feketék között a kisebb incidencia ellenére a megbetegedett nők halálozási rátája nagyobb mértékű volt, mint a fehér populációban (Bowen, 2006).

Askenázi zsidó nők között pl. gyakoribbak a familiáris halmozódást mutató emlőrákok, mint nem zsidó populációkban (Egan, 1996). A férfi emlőrákok előfordulása is jóval gyakoribb zsidók között, mint egyéb népcsoportokban (Katz, 1981). Mindemellett a vizsgálatok általában nem találtak lényeges különbségeket a sporadikus daganatok tekintetében.

## A. Emlőrások a kóreredit szerint

Az úgynevezett örökletes emlőrások az emlőrákos megbetegedések 5-9%-át teszik ki (Ford, 1995). 1866-ban Paul Broca francia patológus, antropológus volt az első aki felfigyelt arra, hogy az emlőrák családi halmozódást mutat, és ez alapján azt feltételezte, hogy az emlőrák kialakulására való hajlam örökletes (Broca, 1866). A megoldás egészen sokáig, az 1990-es évekig váratott magára, amíg sikerült azonosítani az emlőrák kialakulásáért felelős magas penetranciájú BRCA1 és BRCA2 géneket (review: Oláh, 2005).

A BRCA gének mutációin kívül ismeretes több olyan örökletes genetikai károsodás is, amely szintén emlőrák kialakulásához vezethet. Mindazonáltal, e szindrómák (itt nem izolált emlőrákról van szó, hanem daganatos szindrómákról, amelynek egyik – általában nem is kizárólagos – eleme az emlőrák lehet) relatíve ritkán fordulnak elő, és így az örökletes emlőrásoknak csak meglehetősen csekély részéért tehető felelőssé.

Li-Fraumeni szindróma (p53)
Cowden-betegség (PTEN)
Peutz-Jeghers-szindróma (LKB1, STK11)
Muir-Torre-szindróma (Lynch-II-szindr.) (mismatch-repair gének)
Ataxia-teleangiectázia (AT)

II. táblázat. Az örökletes emlőrások kialakulásáért felelős ritkább tényezők.

## **B. Sporadikus emlőrákok:**

Az örökletes emlőrákok csak a kisebb részét képezik az emlőrákos megbetegedéseknek, az esetek túlnyomó többségét a sporadikus esetek jelentik. A sporadikus emlőrákra jellemző, hogy családi halmozódást nem figyelhetünk meg, általában idősebb korban manifesztálódik és gyakran agresszívebb lefolyású. A sporadikus daganatok kialakulásában külső és belső tényezők egyaránt szerepet játszanak.

### **Endogén és egyéb tényezők szerepe**

Figyelembe véve a hormonális tényezők döntő szerepét az emlőrák kialakulásában, a kockázati tényezőket célszerű hormonális és nem hormonális jellegűekre felosztani (III. táblázat), annak ellenére, hogy egyes tényezőknél a hatás részben hormonális, részben más utakon érvényesül (pl. az elhízásnál). Az ösztrogének sejosztódást stimuláló hatásuk mellett reaktív metabolitjaikkal is hozzájárulhatnak a karcinogenezishez. Az elnyújtott ösztrogénexpozíció vagy a magasabb hormonszint emelkedett rákkockázatot jelent (Begg, 1987). Így tehát a korai menstruáció, vagy az első szülés időpontja is fontos kockázati tényező. Ennek további magyarázata az lehet, hogy az emlő epithelium végső differenciációjának protektív hatása fiatalabb életkorban jobban érvényesül (Kampert, 1988). Tehát azok a tényezők, melyek növelik a menstruációs ciklusok számát, növelik az egyén veszélyeztetettségét is.

Az emlőrák kialakulásának kockázatát az elhízás is növeli (Rowan, 2005). Postmenopausális nőkben az ösztrogének fő forrása az androszténdion ösztronná való konverziója, mely a zsírszövetben megy végbe. Így tehát az elhízás folyamatosan magasabb ösztrogénszintet, elnyújtott hormonális kitettséget eredményez (Pujol, 1997).

A nem hormonális kockázatonövelő tényezők közül némelyik közvetve szintén az ösztrogénszintet emeli.

<b>Kockázati tényezők</b>	
<b>Hormonális rizikófaktorok</b>	<b>Nem hormonális rizikófaktorok</b>
Szülések száma	Előző emlőbetegségek
Első szülés időpontja	RTG-sugárzás
Menarche ideje	Trauma
Menopausa ideje	Társadalmi-gazdasági státusz
Szoptatás időtartama	Idősebb életkor
Menstruációk időtartama	Elhízás (hormonális hatások is)
Ovariectomia	Dohányzás
Fogamzásgátló szedése	Alkoholfogyasztás
Postmenopauzális hormonszubsztitúció	

III. táblázat: A sporadikus emlőrások főbb kockázati tényezői

### **Genetikai tényezők szerepe a sporadikus emlőrákban**

A sporadikus emlőrások kialakulásában a környezeti kockázati tényezőkhöz kívül számos alacsony penetranciájú genetikai tényező is szerepet játszik. Ezek önmagukban még nem jelentenek lényeges kockázatot, viszont több „high-risk” allél hordozása már fokozott figyelmet érdemel, hiszen az emlőrák kialakulásának esélye már magasabbá válik.

Ebbe a kategóriába sorolhatók azok a génpolimorfizmusok, melyek az egyéni érzékenységet ugyan csak kis mértékben növelik, de gyakoriságuk miatt az egész populáció járulékos kockázatát nagyobb mértékben befolyásolják, mint a ritka, nagy penetranciájú hajlamosító allélek. A több „high-risk” allélt hordozó egyénben nagyobb valószínűséggel jelenik meg az emlőrák, ha környezeti karcinogénnel exponálódik.

A környezeti karcinogéneket metabolizáló enzimek számos polimorfizmusa rizikófaktorokként jelenik meg a humán karcinogenezisben. Ezek az enzimek felelősek a szervezetbe jutó környezeti karcinogének átalakításáért. Az ún. I-es fázisú enzimek a szervezetbe került prokarcinogéneket aktiválják: elektrofil metabolitokká alakítják, majd a II-es fázisú enzimek valamilyen konjugációs reakcióval inaktíválják azokat, megkönnyítve



kiválasztásukat. A metabolizáló enzimek génjeinek polimorfizmusai kihatással vannak az enzimek aktivitására és indukálhatóságára, ezáltal szerepet játszanak a daganatos betegségek kialakulására való hajlam meghatározásában (Puga, 1997).

A humán emlőszövetben nagy számú karcinogénaktiváló enzim génje fejeződik ki. Ezek nagyrészt a citokróm P450 család tagjai, melyek a  $17\beta$ -ösztradiolt is reaktív metabolittá alakítják (Huang, 1996).

A női nemi hormonok és növekedési faktorok magas szérumszintje szintén emeli az emlőrák kialakulásának kockázatát. Ezáltal a hormonmetabolizmusban résztvevő enzimek génjei, valamint a szteroid-receptorok, mint a hormonhatás közvetítői ugyancsak érintettek az egyéni érzékenység meghatározásában, és vizsgálatok tárgyát képezik.

A sejtciklus szabályozásában, a sejtek túlélésének és apoptózisának kontrollálásában részt vevő gének polimorfizmusai is rizikófaktorként jelennek meg a karcinogenezisben. Ebbe a körbe tartozik a tumor szupresszor hatású p53 fehérje *Arg/Pro* polimorfizmusa, a D-vitamin és analógjai antiproliferatív és apoptotikus hatásait közvetítő D-vitamin receptor (VDR) génjének polimorfizmusai is.

#### ***A D-vitamin szerepe az emlőrák kialakulásában:***

A D-vitamin aktív formája, az 1,25-dihidroxi- $D_3$ -vitamin központi szerepet tölt be a kalcium-háztartásban, a csontosodás metabolizmusában (Christakos, 1996), ezen kívül hatással van a proliferáció, a differenciáció és a programozott sejthalál folyamatára is, mind a normál, mind a transzformálódott sejtekben (Welsh, 2003). Az alacsony D-vitamin szint az idősebb kort kísérő ösztrogén deficienciával, így az emlőrák 2 fontos kockázati tényezőjével is összefügg. Idősebb korban ugyanis csökken a bőrben a cholecalciferol szintézise, az ösztrogén deficiencia pedig csökkenti a D-vitamin metabolikus aktivációját és a D-vitamin receptor expresszióját is (Lips, 2001). Mivel a D-vitamin hiány kockázata az emlőrák legérzékenyebb célcsoportjánál, a posztmenopauzális korban lévő nőknél sokkal magasabb, mint a fiatalabb nőknél, ezért különösen fontos lehet a D-vitamin szerepének pontos tisztázása az emlőrák kialakulásában.

#### ***A D-vitamin proliferációt gátló hatása:***

Az emlőrák kialakulását nagyban befolyásolja a hormonális milliő, ezért mindazon gének, amelyek hormonális aktivitást illetve hormonháztartást, potenciálisan fokozhatják az emlőrák kialakulásának kockázatát. Henderson és Feigelson véleménye szerint azok a gének,

amelyek a szteroid hormonok metabolizmusában és transzportálásában részt vesznek, felelőssé tehetőek a fokozott kockázatért, illetve ezek a gén-gén, valamint gén-környezet kölcsönhatások együttesen befolyásolják az emlőrák kialakulásának kockázatát.

Az egyik ilyen potenciális felelős a nukleáris receptorok szteroid hormon családjába tartozó D-vitamin receptor (VDR), amely számos hormon-érzékeny gén ligand-dependens transzkripciósfaktora (Christakos, 1996; Jurutka, 2001).

#### *D-vitamin és apoptózis:*

A sejtsztódásra gyakorolt gátló hatása mellett a D-vitamin és számos analógja az apoptózisra jellemző morfológiai és biokémiai változásokat indukálnak emlőtumor sejtekben (Welsh 1994, James, 1996, Simboli-Campbell, 1997).

Az apoptotikus hatás alapja molekuláris szinten a bcl-2 fehérjecs család expressziójának szabályozása. Az antiapoptotikus (bcl-2/bcl-XL) és proapoptotikus (Bax, Bak) családtagok expressziójának aránya változik (James, 1996, Danielsson, 1997, Simboli-Campbell, 1997). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-hatásra a Bax a citoszolból a mitokondriumba vándorol, ahonnan citokróm c-t szabadít fel, minek következtében reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkeznek a sejtben (Narvaez és Welsh 2001). Ezen reaktív metabolitok neutralizálása és az oxidatív stressz indukálta apoptózis megakadályozása részben egy kisméretű redox-protein, a thioredoxin funkciójához köthető (Powis, 2000, Welsh, 2003).

A D-vitamin a VDUP-1-nek, egy thioredoxin-kötő protein génjének indukciójával éri el a thioredoxin szint csökkenését, egyben a sejt redukáló képességének visszaesését, ami a reaktív oxigén gyökök akkumulációjához, majd apoptózishoz vezet (Yang, 1998).

#### ***A D-vitamin receptor (VDR) szerepe az emlőrák kialakulásában:***

A D-vitamin receptorát megtalálhatjuk az emlőszövet főbb sejt típusaiban (bazális és lumenális epithelsejtek, „cap” sejtek, stroma-sejtek), de expressziója sejt típusonként valamint időben is változó (Welsh, 2003, Colston 1988, Bhattacharjee 1987, Zinser 2002). A VDR kifejeződésének dinamikus szabályozása az 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> funkcionális szerepét sejteti az emlő fejlődésében (Welsh, 2003).

#### *VDR polimorfizmusok:*

Az 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> szteroid hormon fontos protektív szerepet tölt be a sporadikus emlőrákok kialakulásában. Hatását azonban csak receptorán keresztül fejtheti ki,

mely a 12-es kromoszóma 12q13-12q14 lókuszában elhelyezkedő, kb. 100 kb nagyságú gén, amely egy transzkripciósfaktort kódol. A VDR génben pontmutáció következtében létrejövő genetikai módosulások gyakran a fehérjeszinten is változásokat okoznak, melyek súlyos génaktivációs defektust okozhatnak, így magától értetődő, hogy a D-vitamin tumorsejtek proliferáció gátlásának hatékonyságában VDR gén polimorfizmusainak rendkívül fontos szerepe van.

A humán VDR gén 5'-promóter régióban történt pontmutáció a mRNS expresszióra, és az expressziós mintázatra van hatással, míg a 3' végi nem átlródó régió (UTR) variánsai főként a mRNS stabilitására, és az átírt fehérje transzlációjára van hatással (Valdivielso, 2006).

Ha a pontmutáció olyan pozícióban történik, ahol éppen egy restrikciós endonukleáz hasítási helye van, akkor az adott enzimmel emésztve a DNS fragment hossza különbözik a vad-típusútól, a két változat elektroforézissel könnyen detektálható. Ezeket a polimorfizmusokat összefoglaló néven restrikciós fragment-hossz polimorfizmusoknak nevezzük (RFLP). A D-vitamin receptor több restrikciós fragment-hossz polimorfizmusa ismert az irodalomban, pl. *Tru9I* (Ye, 2000), *TaqI* (Morrison, 1994), *BsmI* (Morrison, 1992), *EcoRV* (Morrison, 1992) és *ApaI* (Faraco, 1989).

#### *BsmI* polimorfizmus:

A *BsmI* polimorfizmus és az emlőrák kapcsolatát vizsgálva Hou és mtsai szignifikáns különbséget kaptak a beteg- és kontroll csoportok alléloszlásai között: a B allélt hordozók rizikója nagyobb volt (Hou, 2002). Hasonló eredmények születtek egy amerikai és egy brit eset-kontroll vizsgálatban, ahol a BB homozigóták emelkedett kockázatát mutatták ki (Ingles, 2000, Bretherton-Watt, 2001). Mások, pl. Buyru és munkatársai ugyanakkor nem találtak összefüggést a *Bsm I* polimorfizmus és az emlőrák kialakulásának kockázata között török populációban (Buyru, 2003).

#### *FokI* polimorfizmus:

Ezideig, a VDR génnek ez az egyetlen ismert protein polimorfizmusa és arra vonatkozóan, hogy ez a polimorfizmus mennyire befolyásolja egyes daganatok kialakulásának gyakoriságát, igen eltérőek az eredmények.

Az F allél protektív hatását mutatták ki pl. bőrrák (Hutchinson, 2000), vastagbélrák (Wong, 2003) és emlőrák esetében (Ingles, 1997). Más eredmények szerint a sporadikus emlőrák és a *FokI* polimorfizmus kapcsolatában viszont nem mutatható ki szignifikáns összefüggés (Curran, 1999, Bretherton-Watt, 2001).

### ***A p53 tumorszuppresszor gén szerepe az emlőrák kialakulásában:***

A p53 tumorszuppresszor gén az egyik legintenzívebben tanulmányozott humán gén. A 17-es kromoszómán (17p13.1) található p53 gént Arnold Levine, David Lane és William Old 1979-ben azonosította. Először onkogénnek gondolták, majd 10 év múlva Bert Vogelstein és Ray White munkacsoportja írta le tumorszuppresszor szerepét. A p53 gén által kódolt p53 fehérje 393 aminosavból álló 53 kDa nagyságú fehérje, mely névadójává is vált. A gyakran „a genom őre”-ként emlegetett p53 fehérje folyamatosan ellenőrzi a DNS integritását. Genomkárosodás esetén a p53 protein felhalmozódik a sejtben, elősegíti a p21 fehérje transzkripcióját, és G1 fázisban leállítja a sejtciklust (Harris, 1993) mindaddig, amíg a károsodás kijavítása meg nem történik, vagy ennek hiányában apoptózist indukál. Így a genetikai állományában sérült sejt osztódását akadályozza meg.

A p53 protein a sejtciklus szabályozásában transzaktivátorként fejt ki hatását és olyan gének átírását aktiválja, melyek gátolják a növekedést és/vagy az inváziót. A p53 tumorszuppresszor gén autoszomális dominánsan öröklődő mutációja tehető felelőssé a Li-Fraumeni szindrómáért, amely a mezenchimális és epitheliális szövetek fiatal korban kialakuló daganatképződéséhez vezet. (Malkin, 1990; Srivastava, 1990).

A p53 DNS-károsodás vagy hiperproliferatív szignálok hatására lép működésbe, és a fiziológiai körülményektől, illetve sejtípustól függően fejt ki hatását. Ha a DNS károsodás nem javítható, a p53 fehérje apoptózis-t indukál. Számos proapoptotikus aktivitással bíró protein expresszióját szabályozza.

Az apoptózis-indukcióhoz hozzájárul egyes antiapoptotikus gének, mint a bcl-2, vagy a c-IAP-2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2) expressziójának gátlása is. A p53 fehérje által indukált apoptotikus folyamat végrehajtó enzimei a proteolitikus aktivitással bíró kaszpázok, melyek szubsztrátfehérjéiket aszparaginsav mellett hasítják.

Ha a daganatképző sejek eliminációja sikertelen volt is, ép p53 funkció esetén némely tumor egy kritikus méretet elérve mégis elpusztulhat. A jelenség oka, hogy egy bizonyos méretet túlnöve a vérellátottság a tumor fejlődését limitáló tényezővé válhat. A kialakult hipoxia aktiválja a p53 fehérjét és apoptózist vált ki, valamint egy antiangiogén faktor, a trombospondin expresszióját is serkenti (Graeber, 1996).

A p53 apoptózist indukáló hatása rendkívül fontos a daganatok terápiája szempontjából is. A sugárterápia és a legtöbb citosztatikum DNS-károsodást idéz elő a tumorsejtekben, melyek azután ép p53 funkció esetén az apoptózissal pusztulnak el. A daganatok progressziója során prognosztikai szempontból súlyos fordulatot jelent a p53 tumor szupresszor funkcióvesztése, mely a daganat agresszívvé válását, kemo- és radioterápiával szembeni rezisztenciáját eredményezi.

#### *Az Arg/Pro polimorfizmus:*

A p53 tumorszupresszor gén mutációja a humán daganatok 50%-ban kimutatható (Hollstein, 1994). A tumorsejtekben megtalálható p53 mutációk nagyrésze mindössze egy bázisban tér el a vad-típusú alléttól, de ezen pontmutációk következtében mutáns fehérje kódolódik a génről. Az így átírt fehérje általában a DNS kötő doménjében sérül, így funkcióképtelen (Cho, 1994).

A p53 gén polimorfizmusainak többsége intronok területére esik, így fehérjeszinten nem jelentkezik. Az exonális polimorfizmusok közül a legjelentősebbet a 4-es exon területén, a 72 aminosav területén találjuk, ahol egy guanin→citozin szubsztitúció hatására a fehérjeszerkezet is módosul. A két allél egyike arginint (CGC), a másik prolint (CCC) kódol (Matlashewski, 1987). A p53 *Arg/Pro* polimorfizmusa nagy etnikai heterogenitást mutat. Az allélfrekvenciák alakulásában egy észak-dél irányú változás figyelhető meg. A p53 *Pro* allél frekvenciája az északi népeknél a legalacsonyabb: Észak-Skandinávia őslakosai, a lappok között 17%-ban van jelen. Déli irányban haladva ez az arány azonban fokozatosan nő: a finneknél 24%, a svédeknel 29%, spanyoloknál 32%, kínaiaknál 38%, indiaiaknál 54%, és a nigériai populáció körében már eléri a 63%-ot (Calle-Martin, 1990, Beckman, 1994).

Az aminosavcsere a fehérje kémiai tulajdonságainak megváltozását vonja maga után: az *arginin* nagy poláros oldalláncának helyébe a *prolin* kis apoláros oldallánca kerül, mely következtében a p53 *Pro* allél sokkal lassabban vándorol a SDS-poliakrilamid gélben, mint az *Arg* allél (Matlashewski, 1987). A két allél eltérő hatékonysággal képes a p53-reszponzív

promóterekről génkifejeződést indítani. A p53<sub>Pro</sub> variáns kétszer hatékonyabb transzkripciós aktivátornak bizonyult, mint a p53<sub>Arg</sub>. A két variáns szekvencia-specifikus DNS-kötő aktivitásában különbség nem mutatható ki, az eltérés a transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatás szintjén jelentkezik. A két allél apoptózist indukáló képességében is különbözik; A p53<sub>Arg</sub> forma gyorsabb kinetikával, hatékonyabban indukál apoptózist, mint a p53<sub>Pro</sub> (Dumont, 2003, Pim, 2004). A humán papilloma vírus (HPV) indukálta cervixrákot vizsgálva a beteg nők körében az *Arg* homozigóták száma jóval magasabb. Storey és munkatársai szerint az *Arg* homozigóta genotípusú egyének hétszeres kockázatot hordoznak a HPV okozta tumorigenezisre, mint a heterozigóták (Storey, 1998).

Mindezeket egybevetve, a két allél biokémiai illetve biológiai aktivitását tekintve strukturálisan vad típusúnak tekinthető, a monoklonális antitesteknek ugyanazon spektrumát képesek kötni, a sejtciklus leállítását azonos hatékonysággal képes indukálni, de funkcionálisan a p53 *Arg* illetve a p53 *Pro* allél nem egyenértékű.

Mint ahogy Storey 1998-as vizsgálatában megfigyelte, az egyes p53 polimorfizmusok és a daganatok előfordulásának gyakorisága számos esetben összefügghet. Több vizsgálatban is úgy találták, hogy a *Pro* allél hordozása fokozottabb daganatos kockázattal jár együtt, bár az eredmények néha ellentmondóak, vizsgálatonként, tumortípusonként, ill. etnikumonként eltérőek. Például a tüdőrák kialakulásának kockázata és a p53 polimorfizmus közötti összefüggésben Kawajiri és Jin munkacsoportjai a p53 *Pro* homozigóták túlreprezentáltságát mutatták ki a betegek közt, míg Weston nem talált szignifikáns összefüggést.

Norvég emlőrákos nők allélmegoszlásait elemezve Själander szignifikáns összefüggést írt le az emlőrák előfordulása és az *Arg/Pro* polimorfizmus között. A *Pro* allélt hordozó homo- és heterozigóta egyének magasabb kockázatát mutatták ki az *Arg* homozigótákkal szemben, és ez a különbség az előrehaladott stádiumú betegcsoportban még kifejezettebbnek bizonyult. Wang-Gohrke és munkatársai a német nők körében végzett vizsgálatukban a *Pro* allélt hordozók nagyobb rizikóját mutatták ki az emlőrák kialakulásában, de eredményük nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét (Wang-Gohrke, 2002). Suspitsin és mtsai nem találtak semmilyen összefüggést a témában (Suspitsin, 2003). Ezek a genetikai polimorfizmusok feltehetően nemcsak a daganatkialakulással, hanem a daganatok progressziójával is kapcsolatba hozhatók, és hatással lehetnek a daganat fenotípusára és prognózisára is.

## I.2. A prevenció szerepe

Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben rohamos fejlődésnek indult a daganatterápia, néhány tumor kivételével fenntartások nélkül még mindig nem jelenthetjük ki, hogy „a daganatok gyógyítható betegségek”. A különböző tumorok ötéves túlélése tekintetében meglehetősen nagyok a különbségek. Például a heretumorok ötéves túlélése 90% fölötti, míg ugyanez 10% alatt van a tüdőrák vagy a hasnyálmirigy-daganatok vonatkozásában (Eurocare 3 Sant, 2003). Az emlőrák kb. 77%-os ötéves túlélési aránnyal a hatékonyabban gyógyítható daganatok közé tartozik, de ez még mindig azt jelenti, hogy minden ötödik emlőrákkal diagnosztizált nő meghal. A daganatterápia ráadásul igen költséges, az utóbbi években kifejlesztett gyógyszerek nagyon drágák.

A fenti tényeket figyelembe véve teljesen világos, hogy hatékony, hosszú távú és költségek tekintetében is elfogadható megoldást csakis az emlőrák megelőzése jelenthet. A daganatmegelőzés, mint az más betegségeknél is így van, magában foglalja a primer, szekunder és terciér prevenciót.

A **primer prevenciót** célszerűen a kockázati tényezők oldaláról kell megközelíteni. Primer prevenciók erőfeszítésnek tekinthetünk az emlőrák esetében minden olyan erőfeszítést, amely az ösztrogén-expozíció mérséklésére irányul, így például a magas hormontartalmú fogamzásgátlók mellőzése, illetve korszerű készítmények kifejlesztése, elővigyázatosság a posztmenopauzális hormonpótlással illetve osteoporosis-prevenció céljából modern szerek alkalmazása, ösztrogén tartalmú gyógyszerek szükségtelen adagolásának mellőzése. Ugyancsak a primer prevenció eszköztárába tartozik a dohányzás mellőzése (egyéni ill. társadalmi szinten), az ismert kémiai rákkeltőkkel való expozíció megelőzése (pl. környezetszennyezés, foglalkozási expozíció, ivóvíz- vagy élelmiszerszennyeződés révén), a túlzott alkoholfogyasztás mérséklése, a testtömeg egészséges szinten tartása (ami magában foglalja többek között a telített zsírok bevitelének mérséklését 10 E% alá, az energiabevitel egészséges szinten tartását, a rendszeres fizikai aktivitást). Ugyancsak primer prevenciónak tekintjük a daganatmegelőző hatású élelmiszerek fogyasztását (pl. omega-3 sorozatú többszörösen telítetlen zsírsavak, flavonoidok és egyéb fitokemikáliák).

A primer prevenció speciális formája a kemoprevenció, amikor is kifejezetten betegségmegelőzési céllal olyan gyógyszert, illetve természetes vagy mesterségesen előállított vegyületet vagy vegyületeket fogyasztunk, amelynek hatását e téren már bizonyították.

Mindezek ellenére a kemoprevenció mind máig szélesebb körben nem került alkalmazásra az emlőrák megelőzésére, figyelembe véve a várható előnyöket és hátrányokat.

A prevenció eszköze a kockázatbecslés is, amely pontosításának, továbbfejlesztésének egyik lehetősége az alacsony penetranciájú genetikai tényezők figyelembe vétele. Mint az az előző részekben olvasható, ezek a tényezők önmagukban nem okoznak jól detektálható kockázatemelkedést, de egymással vagy környezeti tényezőkkel való kölcsönhatásban már számottevő hatásuk lehet.

Az értekezés két ilyen alacsony penetranciájú tényező vizsgálatát tűzte célul, amelyek a p53 tumor szuppresszor gén illetve a D-vitamin receptor gén allépolimorfizmusai.

A rizikóbecslés egy másik útja, a génexpresszió-változások vizsgálata is hasznos kiegészítő lehet. A PhD értekezés primer prevencióval foglalkozó további aspektusa ezen expresszió-változások alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata.

## **Génexpresszió-változások alkalmazása a prevencióban:**

### **c-myc; Ha-ras; p53**

Számos vizsgálat igazolta már, hogy daganatszövetben különböző gének expressziója eltér a normál szövetekben talált génexpresszióktól. Mivel az onkogének és tumor szuppresszor gének a sejtciklus, a sejtproliferáció, a differenciáció és az apoptózis szabályozásában részt vevő kulcsgének, természetes, hogy számos szerző foglalkozott e gének expressziójával. Így például a normál szövetektől eltérő c-myc, Ha-ras, N-ras, Erb-B2, p53 expressziókat írtak le különböző daganatok esetén. További vizsgálatok – összhangban a field of cancerization elméletével – nemcsak a daganatszövetben, hanem az azt körülvevő, makroszkóposan és szövettanilag is egészségesnek tűnő szövetekben találtak onko/szuppresszor gén overexpressziókat. Ez azt jelzi, hogy a génexpresszió-változások alkalmasak lehetnek a korai érintettség jelzésére, akár olyan stádiumban is, amikor még egyéb tényezők – beleértve például a mutációkat is – nem figyelmeztetnek a normálistól eltérő helyzetre.

A **c-myc** protoonkogén egyike a korán felfedezett onkogéneknek. A gén egy olyan nukleáris lokalizációjú fehérjét kódol, amely transzkripciós faktorként működik. A myc



protein képes a nyugalmi állapotban levő sejteket ismét proliferációra bírni, azaz a sejtciklust továbbvinni. A fehérje a Max proteinnel heterodimért képezve szekvencia-specifikusan a DNS-hez kötődik, és transzkripció regulátorként DNS-szintézist indukálva transzformált sejt kialakulását is okozhatja. A c-myc overexpresszióját írták le számos daganatban, illetve transzformált sejtekben, sejtvonalakban. Ugyancsak fokozott c-myc-expressziót találtak egyéb sejtproliferációval járó folyamatokban is.

A **Ha-ras** (Harvey-ras) gén a ras géncsaládba tartozik, melynek további tagjai a Ki-ras és az N-ras gének. A ras géncsalád tagjai által kódolt G-proteinek az intracelluláris jelátviteli kaszkád fontos elemei, vagyis részt vesznek a sejthez érkező proliferációs szignálok továbbításában. A ras proteinek (molekulasúlyuk alapján ezelet p21 fehérjéknek nevezik) a jelátviteli kaszkád kezdeti részében működnek, a sejtmembrán belső felületéhez kötöten. A jelátviteli rendszer valójában foszforilációs kaszkád, amelynek például a raf fehérje vagy a MAP-kinázok (mitogén-aktivált protein kináz) fontos elemei. A kaszkádok végső effektorai a sejtmagban levő transzkripció faktorok. A ras gének overexpressziója e jelátviteli rendszer fokozott aktivitásához vezethet, vagyis a proliferatív szignálok túlzott mértékű áttevődését eredményezheti. Ennek megfelelően – és a másik két említett génhez hasonlóan – a Ha-ras gén overexpresszióját is számos daganatban megtalálták. A génexpresszió-változások korai biomarkerként való alkalmazásának értékét mutatja, hogy hörcsög pofazacsókjának dimetilbenz[a]antracénnal való ecsetelése hatására Ha-ras overexpresszió alakult ki, értékelhető szövettani elváltozások nélkül.

A **p53** tumor szuppresszor gén funkciójáról allélpolimorfizmusai kapcsán már részletesen szó esett korábban, így itt csak annyit szükséges megemlíteni, hogy a p53 esetében a szabályozás elsősorban poszttranszlációs mechanizmusokon keresztül történik. Mindazonáltal az mRNS szintű expresszió-változások is fontosak és informatívak lehetnek, ugyanis több vizsgálat is talált p53 transzkripció változásokat daganatos szövetekben illetve sejtvonalakban.

A **másodlagos megelőzés** lényege a betegség minél korábbi diagnózisa, még tünetmentes stádiumban, amikor kezelés esélyei lényegesen jobbak, mint a már kialakult – esetleg a környező szöveteket is infiltráló és áttéteket is adó – daganatok esetén. A szekunder prevenció tipikus formája a lakossági szűrővizsgálatok megszervezése. Ennek lényege, hogy az egészségügy oldaláról történik a kezdeményezés, és a célcsoport pedig az egészséges lakosság, illetve annak meghatározott – de mindig meglehetősen széles – köre. Emlőrák vonatkozásában a fizikális vizsgálat és a mammográfia képezi a lehetséges módszereket. A fizikális vizsgálat történhet orvos (vagy erre kiképzett egészségügyi szakdolgozó) által, illetve végezheti maga az érintett személy (önvizsgálat). Mindegyiknek megvan a maga sajátos előnye és hátránya is, de közös, hogy önmagukban ezen módszerek alkalmazása nem oldja meg kielégítően a korai felismerés problémáját. Áttörést jelentett az emlőrákszűrésben a mammográfia bevezetése, illetve az e téren fokozatosan bekövetkező technikai fejlődés.

A fentiekkel összhangban a Nemzeti Rákellenes Program célja olyan szolgáltató rendszer kialakítása, amely képes a célcsoportba tartozó nők 80%-ának szűrésére.

A **tercier prevenció** a szövődmények megelőzését, az életminőség minél jobb megtartását vagy visszaállítását, a rehabilitációt jelenti. Daganatok esetén a terciér prevenció fontos kérdéskörét képezik többek között a citosztatikus kezelések mellékhatásainak kivédése valamint a metasztázisok kialakulásának megelőzése. A citosztatikus kezelésekkal kapcsolatban fontos, hogy pontosan ismerjük a daganat biológiai tulajdonságait, és ehhez, valamint a várható prognózishoz igazítsuk a kezelést. Várhatóan rosszabb prognózis esetén sajnos kevésbé lehetünk tekintettel a mellékhatásokra, hiszen ilyenkor csak a lehető leghatékonyabb terápia mellett van esély a gyógyulásra (természetesen nem ideértve a csak palliatívan kezelhető eseteket), míg jobb prognózisú tumoroknál lehetőség van a kevesebb mellékhatást okozó alternatívák választására.

A mellékhatások, szövődmények (például az esetleges szekunder tumorok kialakulása) megbízható mérése, illetve előrejelzése egyelőre nem megoldott. Nem tudjuk megállapítani, hogy ki az, akinél a kezelés nagyobb valószínűséggel okoz szövődményeket, és kik azok, akik nagyobb dózist is elviselnek. Az akut tünetek súlyossága nem feltétlenül igazít el a késői karcinogenitás kérdésében.

A dolgozatban vizsgálni kívántunk egy újszerű megközelítést a citosztatikus kezelés karcinogén hatásainak vizsgálatára, azzal a céllal, hogy a terápia indukálta második primer tumor kockázata vajon becsülhető-e? Ez a fent már említett génexpresszió-változásokon alapul, ahol perifériás vérből nyert fehérvérsejteken, mint „surrogate tissue”-n alkalmaztuk

(helyettesítő szövet). A primer prevenciós vizsgálat folytatásaként, továbbfejlesztéseként emlőrákos betegekben nemcsak a diagnózis felállításakor, hanem a kezelés után is megvizsgáltuk a c-myc, Ha-ras és p53 gén expresszióját, aszerint csoportosítva, hogy kemoterápiára (Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracyl = CMF) vagy műtétre került-e sor első beavatkozásként. Így a kezelés hatékonyságának valószínű jellemzése mellett lehetőség nyílt az esetleges mellékhatás jelzésére, de a reparációs kapacitás mérésére is.

Hogy kísérleti eredményeink egzaktabbak legyenek, ugyanezen kemoterápiás protokoll hatását megvizsgáltuk állatkísérletben, annak tisztázására, hogy a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézetében korábban kidolgozott állatkísérletes modellben a fent alkalmazott kemoterápiás protokoll okoz-e onko/tumor szuppresszor gén overexpressziókat. Amennyiben igen, akkor ez azt jelenti, hogy a humán vizsgálat eredményei elfogadhatók, és a perifériás vérből kapott eredmények összhangban állnak az állatkísérletekben a különböző szervekben mért értékekkel, vagyis alkalmazhatók azok helyettesítő markereiként.

## ***II. Célkitűzések***

1. Annak eldöntése, hogy az általunk vizsgált reprezentatív csoportban a p53 tumor szuppresszor gén 72-es kodon Arg/Pro polimorfizmusa befolyásolja-e az emlőrák kialakulásának kockázatát eset-kontroll összehasonlítást végeztünk. Az egyes allélek előfordulási gyakoriság alapján kerestünk választ arra, hogy melyik allél fordul gyakrabban elő az emlőrákos betegekben.
2. Tisztázni akartuk, hogy a D-vitamin receptor *BsmI* és *FokI* polimorfizmusa hatással van-e az emlőrák kockázatára. A fentihez hasonló módon, a *BsmI* és *FokI* allélok előfordulási gyakoriságát vetettük össze emlőrákos betegek és kontrollok között.
3. A p53 tumor szuppresszor gén és a D-vitamin receptor gén polimorfizmusai közötti összefüggés alapján azt kívántuk megállapítani, hogy a feltételezett „high-risk” allélt hordozók között milyen mértékben emelkedett az emlőrák kialakulásnak kockázata.
4. Perifériás vérből génexpresszió-változásokat mértünk. Az emlőrák kockázatának és/vagy az expozíció jelzésének modellezéséhez összevetettük a c-myc, Ha-ras és a p53 gének expresszióját az emlőrákos betegekben és nem daganatos személyekben.
5. A Cyclophosphamid Methotrexat Fluorouracyl kemoterápia génexpressziókra gyakorolt hatásának vizsgálata. Az emlőrákos betegek kezelése után (műtét vagy citosztatikus kezelés CMF protokollal) mért génexpresszió-értékeket hasonlítottuk össze a kezelés megkezdése előtti expressziókkal, azzal a céllal, hogy a második primer tumor kialakulása kapcsolatban állhat-e a CMF kezeléssel?
6. A CMF protokoll génexpressziókra gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletben. A kísérleti állatok szerveiben mértük a CMF kezelés hatására bekövetkező génexpresszió-változásokat azzal a céllal, hogy az. állatkísérletes eredmények és a humán perifériás vér vizsgálatok eredményei miként egészítik ki egymást?

### ***III. Anyag és módszer***

Az eset-kontroll vizsgálatban 200 emlőrákos beteget genotipizáltunk a p53 és VDR géenekre vonatkozóan, és a kapott allélgyakoriságokat összehasonlítottuk a kontroll populáció alléleloszlásaival. A kontroll csoport létszáma, átlagos életkora, neme és etnikai összetétele megfelelt a beteg csoport hasonló paramétereinek.

Az emlőrákos betegek a Baranya Megyei Kórház Onkológiai Osztálya, a Veszprém Megyei Csolnoky Ferenc Kórház Onkológiai Osztálya és a Vas Megyei Markusovszky Kórház Onkoradiológiai Osztálya által gondozott betegek voltak. Kontrollként ugyanezen megyék területéről nem daganatos betegek, illetve szűrővizsgálaton részt vevő egészséges személyek szolgáltak. Mivel nem az örökletes emlőrákokat, hanem a sporadikus daganatok kialakulásában szerepet játszó tényezőket kívántuk vizsgálni, ezért a vizsgálatból kizártuk azokat az eseteket, melyeknél a családi anamnézis vagy genetikai vizsgálatok örökletes daganatot vagy daganatos szindrómát jeleztek. Az emlőrákos betegek átlagéletkora 64.3 ( $\pm 7.2$ ), a kontroll csoporté pedig 62.9 ( $\pm 8.2$ ) év volt. Mind a beteg, mind a kontroll csoport tagjaival ismertettük a vizsgálat célját, akik ezután a vizsgálatban önként vettek részt. A beteg és a kontroll csoportot hormontartalmú gyógyszerek szedése és életkor alapján illesztettük egymáshoz.

#### **Fehérvérsejtek izolálása**

A fehérvérsejteket 15 ml perifériás vérből nyertük, 0.84% ammónium-kloriddal történő ismételt centrifugálással. A centrifugálást addig ismételtük, amíg a kapott üledék piros ill. rózsaszínű színét elveszítette.

## III.1. Polimorfizmus vizsgálatok

### A p53 *Arg/Pro* polimorfizmus vizsgálata

#### *Allélspecifikus PCR reakció:*

A p53 *Arg/Pro* polimorfizmusát allélspecifikus PCR segítségével vizsgáltuk. A módszer alapja, hogy a PCR reakcióhoz válsztott 5' primer 3' végi nukleotidja megfelel a 72-es kodonban lévő pontmutáció helyének. A DNS polimeráz csak akkor képes a primert rendeltetésszerűen használni, és a szintézist megkezdeni, ha annak 3' vége komplementer a templáttal. Ha tehát két csőben párhuzamosan, ugyanazzal a 3' primerrel, és az utolsó bázisukban eltérő 5' primerek egyikével végzünk amplifikációt, a PCR termékek jelenléte, ill. hiánya alapján a genotípus meghatározható.

3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA

5' primerek: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG (1)

ATGCCAGAGGCTGCTCCCCC (2)

Az (1)-es primer az *Arg* (CGC), míg a (2)-es a *Pro* (CCC) allél jelenlétében teszi lehetővé az amplifikációt. Ily módon, ha a két csőben párhuzamos reakcióban keletkezett PCR termékeket elektroforetizáljuk, homozigóta esetén csak az egyik csőben jelenik meg kimutatható mennyiségű DNS, míg heterozigótánál mindkét primerpárral sikeres amplifikáció mutatható ki (Murata, 1996).

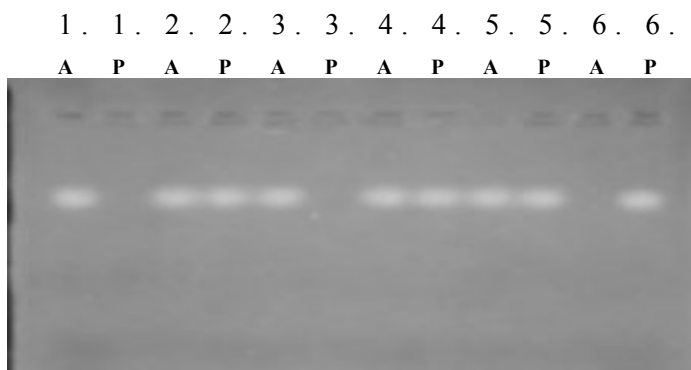
PCR reakcióelegy: 20 µl ösztérfogatban 0.1 µg DNS-templát (A DNS izolálása standard fenol-kloroformos módszerrel történt, a perifériás fehérvérsejtekből), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 2 µg/ml bovin szérumalbumin, 4x0.2 mM dNTP, 0.5 U Taq DNS- polimeráz (PROMEGA), 1-1 µM primer. A reakciót 10 perces 94 °C-on történő inkubálással kezdtük, és a reakcióelegyhez a Taq DNS polimerázt ezután adtuk hozzá.

A PCR paraméterei az alábbiak voltak: 30 ciklus: 60 sec 94°C, 60 sec 60°C, 60 sec 72°C (Techne Genius PCR-készülékben).

### *DNS detektálás:*

Az amplifikálást követően a minták teljes mennyiségét ethidium-bromiddal festett 2%-os agaróz gélen futtattuk.

Az elektroforézist 70 V feszültséggel, 40 mA áramerősség mellett végeztük. 30-60 perces futtatás után az amplifikált, festett DNS sávok jelenlétét, ill. hiányát UV fény segítségével detektáltuk.



**3. ábra: p53 allélspecifikus PCR.**

Annak alapján, hogy a párhuzamos reakciókban mely allélspecifikus primerrel történt reakció, megállapítható az egyén genotípusa. A képen látható gélen az 1-es és 3-as minták *Arg* homozigóta egyénektől; a 2-es, 4-es, 5-ös heterozigótáktól; míg a 6-os *Pro* homozigóta személytől származik.

### **A VDR polimorfizmusok vizsgálata**

A VDR gén polimorfizmusainak vizsgálatához PCR-RFLP (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus) módszert alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy a restrikciós enzim felismerési helyén jelentkező polimorfizmus kimutatásához az adott DNS-szakaszt polimeráz láncreakció segítségével felsokszorozzuk, majd emésztésnek vetjük alá. A keletkezett DNS-fragmentek hosszuktól függően gélelektroforézissel szétválaszthatóak, a gélen megjelenő mintázat alapján az egyén genotípusa meghatározható.

### ***BsmI* polimorfizmus**

*PCR:*

A VDR gén 3' végére eső polimorfizmus vizsgálatához a *BsmI* restrikciós endonukleáz hasítási helyét tartalmazó 825 bázispár hosszúságú DNS-fragmentet PCR segítségével amplifikáltuk. A polimeráz láncreakcióhoz a következő primereket használtuk:

5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'

5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'

PCR reakcióelegy: 25 µl ösztérfogatban 2 µl templát (teljes vér), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4x0.1 mM dNTP, 0.01-0.01 mM primer, 1 U Taq DNS polimeráz.

A reakció további paraméterei: először 4 perc 94°C, majd 35 ciklus: 30 sec 94°C, 30 sec 63°C, 60 sec 72°C, végül 2 perc 72°C (Techne Genius PCR-készülékben).

*RFLP:*

A PCR segítségével amplifikált 825 bp hosszú DNS-fragmentet ezután *BsmI* restrikciós enzimmel való emésztésnek vetettük alá (3 óra, 65°C). Az emésztést követően a minták teljes mennyiségét ethidium-bromiddal festett 1,5%-os agaróz gélen futtattuk. Az elektroforézist 70 V feszültséggel 45-60 percig végeztük, ezután a gélt UV fény alatt vizsgáltuk.

A *BsmI* enzim hasítási helyének hiánya esetén a 825 bp hosszú termék jelenik meg a gélen (B allél). Ha a hasítási hely jelen van (b allél), azt a PCR termék feldarabolódása (650bp + 175 bp) jelzi. A gélen megjelenő fragmentek hossza alapján mindhárom genotípus azonosítható.

1.            2.            3.





#### 4. ábra: *Bsm* I RFLP

Ha csak a 825 bp hosszú DNS-szakasz jelenik meg a gélen (1-es minta), az BB homozigóta genotípust jelez. Ha csak a rövidebb, 650 és 175 bp hosszúságú fragmentek detektálhatók, az egyén bb homozigóta (3-as minta). A teljes hosszúságú amplifikátum és a hasított fragmentek egyidejű előfordulása (2-es minta) Bb heterozigóta genotípusra utal.

#### ***Fok*I polimorfizmus**

##### *PCR:*

A II-es exon területére eső polimorfizmus vizsgálatához a *Fok*I restrikciós endonukleáz hasítási helyét tartalmazó 265 bázispár hosszúságú DNS-fragmentet PCR segítségével amplifikáltuk. A polimeráz láncreakciót a következő primerekkel végeztük:

5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT -3'

5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC -3'

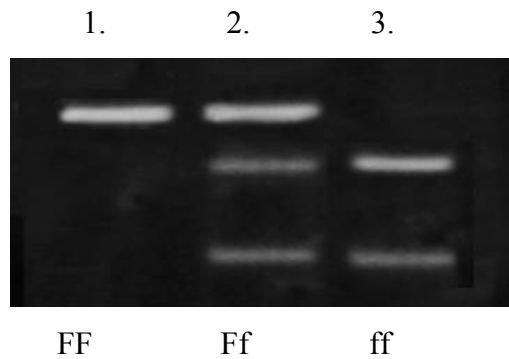
PCR reakcióelegy: 25 µl ösztérfogatban 2 µl templát (teljes vér), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4x0.1 mM dNTP, 0.01-0.01 mM primer, 1 U Taq DNS polimeráz.

A reakció további paraméterei: először 4 perc 94°C, majd 35 ciklus: 30 sec 94°C, 30 sec 58°C, 60 sec 72°C, végül 2 perc 72°C (Techne Genius PCR-készülékben).

##### *RFLP:*

A PCR segítségével felsokszorozott 265 bp hosszú DNS-fragmentet ezután *Fok*I restrikciós enzimmel való emésztésnek (3 óra, 37°C) vetettük alá, majd az emésztést követően a minták teljes mennyiségét ethidium bromiddal festett 2%-os agaróz gélen futtattuk. Az elektroforézist 70 V feszültséggel 30-60 percig végeztük, ezután a gélt UV fény alatt vizsgáltuk.

A *Fok*I hasítási hely hiánya a F allélt definiálja, ez esetben a gélen a teljes hosszúságú PCR-termék jelenik meg. Ha a hasítási hely jelen van (f allél), akkor az enzim egy 196 és egy 69 bázispár hosszú fragmentre vágja szét az amplifikált szakaszt. Ennek megfelelően a három lehetséges genotípus (FF, Ff, ff) könnyen azonosítható.



5. ábra: *FokI* RFLP

### III.2. Génexpresszió-változások vizsgálata

A humán vizsgálatban a fenti kórházakból származó 33 frissen diagnosztizált emlőrákos, 54 műtét után CMF kezelésben részesült, és 31 műtét után CMF kezelést nem kapott beteg, illetve 50 egészséges kontroll személy vett részt. A génexpresszió-változások vizsgálatát a polimorfizmusok vizsgálatától függetlenül, más betegeken végeztük. A perifériás fehérvérsejtekből fonol-kloroformos módszerrel össz-RNS-t izoláltunk, majd Hoefer slot-blotter segítségével 10 µg RNS-t vittünk Hybond N+ (Amersham) membránra, az Amersham ECL-kitben megadott protokoll szerint, majd kemilumineszcensen jelölt (Amersham ECL, „enhanced chemiluminescence labeling”) próbával 42 °C-on éjszakán át hibridizáltuk a gyártó által megadott protokoll alapján. A jelöléshez a *Ha-ras*, *c-myc*, *p53* és  $\beta$ -aktin gének plazmidba illesztett klónozott génpróbáit (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) intézetünkben *E. coli* HB 101 baktériumtörzsben szaporítottuk. A membránokat kontrollként a konstitutívan expresszáldó  $\beta$ -aktin génnel rehibridizáltuk. A keletkező kemilumineszcens jelet röntgenfilmen fogtuk fel, melyet előhívás után HP DeskScan IIC típusú szkennelrel számítógépbe vittük, és a denzitásokat Quantiscan 2.0 (Biosoft) programmal értékeltük.

Az állatkísérletekben csoportonként 6 hím illetve 6 nőstény CBA/Ca egeret használtunk. A CMF kezelés intraperitoneálisan történt, az alábbi dózissal: 100 mg/kg cyclophosphamide, 50 mg/kg methotrexate, 100 mg/kg 5-fluorouracil (5-FU). A kezelés után 24 órával az állatokat túlaltattuk, a májat, lépét, tüdőt, vesét, thymust, mesenterialis

nyirokcsomókat és a femur csontvelőt eltávolítottuk, és a továbbiakban a humán vizsgálatoknál leírt módszerekkel végeztük az RNS izolálást és a génexpressziók meghatározását. A kontroll állatok CMF kezelés helyett fiziológias sóoldatot kaptak.

### **III.3. Statisztikai módszerek**

Statisztikai elemzéssel meghatároztuk az egyes allélokhoz, ill. allélkombinációkhoz köthető becsült relatív kockázatot (esélyhányados, odds ratio: OR) és 95%-os megbízhatósági tartományt (konfidencia intervallum: CI) számoltunk. A génexpressziós vizsgálatokban a csoportok átlagértékeit t-próbával hasonlítottuk össze. A számításokat az Epi Info for Windows (CDC, Atlanta) és az SPSS PC+ programok segítségével végeztük.

## ***IV. Eredmények***

A 200 emlőrákos betegből és a kísérleti csoporthoz igazított kontroll populációból származó minták feldolgozása során a következő eredményeket kaptuk.

### **IV.1. Polimorfizmus vizsgálatok**

#### **A p53 allélpolimorfizmus összefüggése az emlőrák kialakulásának kockázatával**

Az *Arg/Pro* polimorfizmus vizsgálata során kapott genotípus-megoszlásokat a IV. táblázat mutatja a beteg és a kontroll csoportban. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében zárójelben látható az egyes genotípusok csoportokon belüli előfordulásának százalékos aránya.

	Beteg	Kontroll
<i>Arg/Arg</i>	105 (52,5%)	137 (68,5%)
<i>Arg/Pro</i>	60 (30%)	56 (28%)
<i>Pro/Pro</i>	35 (17,5%)	7 (3,5%)
<b>Összesen</b>	200 (100%)	200 (100%)

IV. táblázat: A p53 genotípusok megoszlása a beteg és kontroll csoportban

A kontroll csoportban kapott allélmegoszlást az irodalmi adatokkal összevetve azt látjuk, hogy a magyar populáció allélgyakoriságai az európai populációkra közölt értékek közé esnek, és inkább az északi népek allélfrekvenciáit közelítik.

Az eredményekből megállapítható, hogy a ritka *Pro* homozigóták gyakorisága a betegek közt lényegesen megnő, míg az *Arg* homozigóták aránya csökken a kontroll populációhoz képest. Az adatok további értelmezéséhez statisztikai elemzést végeztünk, amelyhez a *Pro* homo- és heterozigótákat egy halmazba vontuk össze, mivel mindkét csoport hordozza a magasabb rizikót jelentő allélt (V. táblázat).

	Beteg	Kontroll
<b><i>Pro</i> hordozó</b>	<b>95 (47,5%)</b>	63 (31,5%)
<b><i>Arg</i> homozigóta</b>	<b>105 (52,5%)</b>	137 (68,5%)
<b>Esélyhányados (OR)</b>	<b><u>1,97 (95%-os CI: 1,28-3,02)</u></b>	

V. táblázat: A *Pro* hordozó személyek aránya a beteg és kontroll populációban

Vizsgálatunkban tehát a *Pro* hordozó személyek rizikójának emelkedését mutattuk ki, mivel az emlőrákos betegek csoportjában gyakoribb volt a *Pro* allél jelenléte. A p53 *Arg/Pro* polimorfizmus és az emlőrák kialakulásának kockázata közötti kapcsolatot elemezve statisztikailag szignifikáns eredményt kaptunk: a ritka, *Pro* allélt hordozók 1.97-szeres rizikót hordoznak a betegség kialakulására (OR:1.97; 95%-os CI:1.28-3.02).

### A VDR allélpolimorfizmusok összefüggése az emlőrák kialakulásának kockázatával

A VDR allélpolimorfizmusok vizsgálata során kapott genotípus-eloszlásokat az VI. táblázat mutatja.

	Beteg	Kontroll
<b><i>FokI</i> polimorfizmus</b>		
<b>FF</b>	<b>63 (31,5%)</b>	68 (34%)
<b>Ff</b>	<b>114 (57%)</b>	101 (50,5%)
<b>Ff</b>	<b>23 (11,5%)</b>	31 (15,5%)
<b><i>BsmI</i> polimorfizmus</b>		
<b>BB</b>	<b>51 (25,5%)</b>	29 (14,5%)
<b>Bb</b>	<b>92 (46%)</b>	115 (57,5%)
<b>Bb</b>	<b>57 (28,5%)</b>	56 (28%)

VI. táblázat: A beteg és kontroll csoport genotípusainak megoszlása vizsgált VDR polimorfizmusok tekintetében

A *FokI* polimorfizmus esetében a kontroll csoport genotipizálásával kapott alléloszlások nem térnek el jelentősen az európai nők körében végzett vizsgálatok eredményeitől. Hasonló F allél gyakoriságot kaptunk (59.25%), mint amit a francia (62%), vagy olasz (63.5%) nők körében végzett vizsgálatokban publikáltak (Eccleshall, 1998, Gennari, 1999). Az eredmények számottevően különböznek viszont az afroamerikai nők alléloszlásaitól, ahol az F allél frekvenciája eléri a 80.5%-ot (Harris, 1997).

A *BsmI* polimorfizmust vizsgálva a B allél gyakorisága a kontroll populációban 43%-nak bizonyult. Az olasz nők között ez az arány 48% (Ruggiero, 1998). Egy korábbi, magyar populáción végzett jelentősen kisebb mintaszámmal dolgozó vizsgálatban ez az érték 36% volt (Császár és Ábel 2001).

A VDR polimorfizmusok és az emlőrákos megbetegedések közötti kapcsolatot vizsgálva a következő eredményeket kaptuk az adatok elemzéséből (VII. táblázat).

A vizsgált allélpolimorfizmusok	Esélyhányados (OR)	95%-os konfidencia intervallum
<b><i>FokI</i> (F homozigóta)</b>	<b>0,89</b>	0,58-1,39
<b><i>BsmI</i> (B homozigóta)</b>	<b><u>2,02</u></b>	<b><u>1,18-3,46</u></b>

VII. táblázat: A vizsgált VDR polimorfizmusok emlőrák kialakulására gyakorolt hatása

Az irodalmi adatok alapján az FF genotípus emlőrák kialakulásával szemben mutatózó protektív hatását vártuk, de ezt az összefüggést nem sikerült bizonyítani. Az FF homozigóták ugyan kevesebben vannak a betegek között, de az eredmény nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

A *Bsm I* polimorfizmus esetében ugyanakkor statisztikailag szignifikáns kockázatemelkedést mutattunk ki a BB genotípushoz kapcsolódóan. A homozigóta, high-risk allélt hordozó nők kockázata 2.02-szeres a b homo- és heterozigótákkal szemben.

## A gének közötti kölcsönhatás vizsgálata

A gén-gén kölcsönhatás elemzéséhez az egyes polimorfizmusok esetében magas rizikót jelentő genotípusok együttes előfordulását vizsgáltuk a beteg és kontroll populációkban. Az elemzéshez azokat a személyeket választottuk ki mindkét csoportból, akik

a p53 polimorfizmus vizsgálata kapcsán kockázatnövelő tényezőnek bizonyult *Pro* allélt hordozzák, s emellett *Bsm I* genotípusukat tekintve szintén emelkedett rizikót hordozó BB homozigóták.

A VIII. táblázatból kitűnik, hogy azok az egyének, akik a funkcióikban részben átfedő gének magas rizikót jelentő allélkombinációit hordozzák, jelentősen túlreprezentáltak a beteg csoportban a kontroll populációhoz viszonyítva. Az ilyen genotípus-kombinációval bíró nők relatív kockázata 4,87-szeres emelkedést mutat.

A vizsgált genotípus	Előfordulás		OR	95%-os CI
	Beteg	Kontroll		
<i>P53 Pro</i> hordozó	95 (47,5%)	63 (31,5%)	<u>1,97</u>	<u>1,28-3,02</u>
<i>BsmI BB</i>	51 (25,5%)	29 (14,5%)	<u>2,02</u>	<u>1,18-3,46</u>
<b><i>P53 Pro</i> hordozó+ <i>BsmI BB</i></b>	<b><u>30 (15%)</u></b>	<b><u>7 (3,5%)</u></b>	<b><u>4,87</u></b>	<b><u>2,02-13,42</u></b>

VIII. táblázat: A magas rizikójú genotípusok együttes előfordulása, a gének közötti kölcsönhatás

A gének közötti kölcsönhatás elemzésének egy másik megközelítési módja annak vizsgálata, hogy az egyik gén tekintetében emelkedett rizikót jelentő genotípus milyen arányban fordul elő együtt a másik gén „high-risk” alléljaival a beteg, ill. a kontroll csoportokban.

Ehhez az elemzéshez a *BsmI BB* homozigóta egyéneket válogattuk ki mindkét csoportból, és azt vizsgáltuk, hogy az emelkedett rizikót jelentő VDR genotípus mely p53 allélekkel kombinálódik az emlőrákos, ill. a kontroll csoportban.

BB homozigóta egyének a kontroll populációban 29-en, míg a daganatos betegek között 51-en voltak. P53 genotípus-megoszlásaikat a következő táblázat mutatja.

p53 genotípus	BB homozigóta	
	Beteg (51)	Kontroll (29)
<i>Arg/Arg</i>	<b>21 (41,2%)</b>	22 (75,9%)
<i>Arg/Pro</i>	<b>23 (45,1%)</b>	7 (24,1%)
<i>Pro/Pro</i>	7 (13,7%)	—

IX. táblázat: A BB homozigóta egyének p53 genotípusai a beteg és kontroll csoportokban

Látható, hogy a kontroll csoportban az emelkedett rizikót jelentő BB genotípussal többnyire a protektív *Arg/Arg* genotípus kombinálódik, és hogy a BB *Pro/Pro* genotípus-kombináció csakis a betegek között fordul elő.

Míg tehát a kontroll csoport BB homozigótái p53 genotípusukat tekintve túlnyomó többségükben (76%) *Arg* homozigóták, kisebb részben (24%) *Arg/Pro* heterozigóták, addig a beteg csoportban az *Arg* homozigóták aránya (41%) lecsökken, s a BB genotípushoz többnyire egy (45%), vagy kettő (14%) *Pro* allél társul.

Összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy az emelkedett rizikóval járó allélek együttes előfordulása inkább az emlőrákos populációt jellemző jelenség, a kontroll csoportban ritkábban fordul elő, hogy az egyes polimorfizmusokhoz kapcsolódó kockázatnövelő allélek egyszerre vannak jelen a genomban.

Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgálatunkban résztvevő gének „high-risk” alléljainak halmozódása komolyabb visszaesést jelent a tumor szupresszor funkciók hatékonyságában, ezáltal az ilyen genotípusú személyek sejtjeiben nagyobb a valószínűsége mutációk felhalmozódásának. A p53 és a D-vitamin-receptor apoptózis-indukáló képessége ugyanakkor egymástól független, az egyik gén „high-risk” alléljának kevésbé hatékony működését részben kompenzálhatja a másik gén előnyösebb alléljának jelenléte.

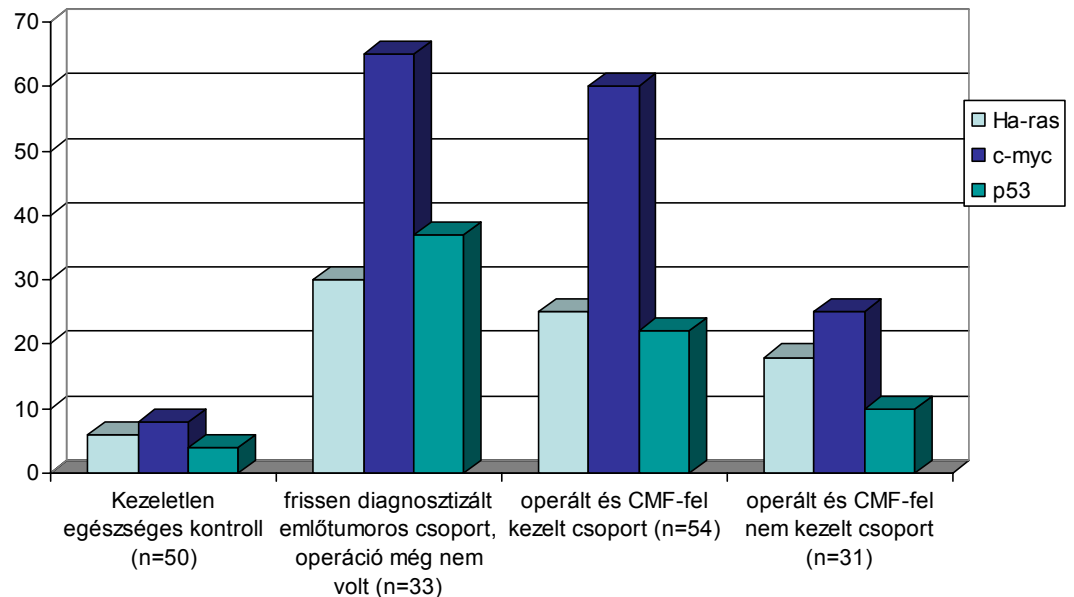
Csoportszintű vizsgálatunkban tehát szignifikáns összefüggést kaptunk polimorf gének egyes, előfordulásukban teljesen általános variánsai, és az emlőrák kialakulásának kockázata között. Habár az egyes „high-risk” allélek az egyéni kockázatot csak kis mértékben emelik, a génpolimorfizmusokból adódó egyéni érzékenységbeli eltérések, mint azt a gének közötti interakció vizsgálatok sikerült is kimutatnunk, együttesen, egymással (és feltehetően a környezeti tényezőkkel) kölcsönhatásban komolyabb mértékben befolyásolják a daganatos betegségek kialakulásának valószínűségét



## IV.2. Génexpresszió-változások vizsgálatai

### A humán vizsgálat eredményei

A perifériás vérből mért génexpressziók a 6. ábrán láthatók.



6. ábra. A vizsgált gének expressziója emlőrákos betegekben és kontrollokban

Az egészséges kontroll személyeknél a vizsgált gének expressziója viszonylag alacsony szinten mozgott. A frissen diagnosztizált emlőrákos betegekben mindhárom gén expressziója statisztikailag szignifikánsan különbözött a kontrollokétól. Ezek az adatok mindenképpen mutatják a génexpresszió-változások értékét, alkalmazhatóságát, bár az eredmények önmagukban nem árulják el, hogy mi áll a perifériás vérből izolált sejtekben mért gén-overexpressziók hátterében.

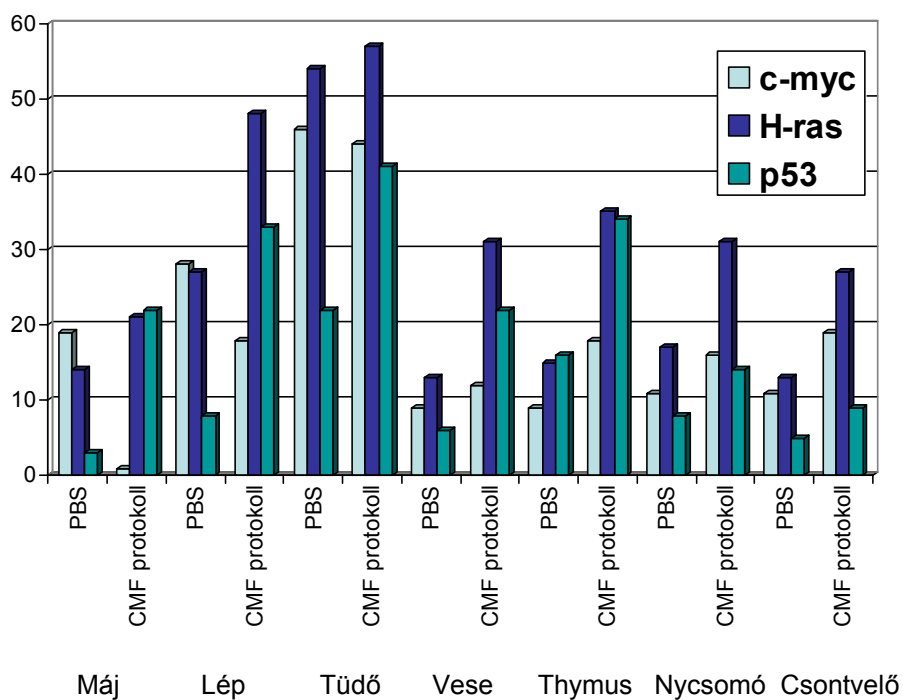
A műtéten átesett betegekben – amennyiben a génexpresszióvizsgálat időpontjáig nem kaptak citosztatikus kezelést – a gén-overexpressziók jelentősen csökkentek a frissen diagnosztizált csoporthoz képest, de a kezeletlen kontrolloknál magasabb értékeket mutattak mindhárom gén vonatkozásában.

Végül a műtét után CMF kezelésben is részesült betegek körében minimális csökkenés volt tapasztalható a frissen diagnosztizált csoporthoz viszonyítva.

Ha az utóbbi két csoportot vetjük össze, akkor az egyetlen különbség a CMF-kezelés. Eszerint tehát a műtét után CMF-kezelésben részesült betegekben mindhárom vizsgált gén expressziója lényegesen magasabb volt (a c-myc és a p53 gén esetében több, mint duplája) a CMF protokollt nem kapott betegeknél.

## Az állatkísérletek eredményei

Az eredményeket a 7. ábra mutatja.



7. ábra. CMF protokoll hatására bekövetkező génexpresszió-változások (CBA/Ca egerekben)

A Ha-ras onkogén expressziója kivétel nélkül minden szervben emelkedett volt a kontrollokhöz képest. Ez az emelkedés statisztikailag szignifikáns volt a lép, vese, thymus, nyirokcsomók és a csontvelő esetén, míg a májnál kis mértékben elmaradt ettől, a tüdőben pedig viszonylag kis mértékű volt.

A p53 tumor szupresszor gén szintén overexpresszált volt minden szervben, itt egyedül a csontvelőben talált expresszió-fokozódás nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

A c-myc onkogén expressziója az előző két génnél változatosabb képet mutatott. A májban, a lépben és a tüdőben a CMF-kezelt csoportban alacsonyabb génexpressziókat találtunk, mint a fiziológias sóoldattal kezelt kontrollokban. A különbség a tüdő esetén minimális volt, míg a májnál és a lépénél statisztikailag szignifikáns. A további négy vizsgált szervben a CMF protokoll fokozta a c-myc gén expresszióját, ami a thymus és a csontvelő esetén statisztikailag is szignifikáns volt.

Eredményeink tehát azt mutatták, hogy a Ha-ras és a p53 gének overexpressziója jól jelzi a CMF protokoll potenciális karcinogén hatását, míg a c-myc gén ebből a szempontból kevésbé hasznos biomarker. Az eredmények egyúttal azt is jelzik, hogy az értékelést szervspecifikusan kell elvégezni, mivel az alap-génexpressziók, illetve a génexpressziós mintázat szervenként különböző lehet.

## V. Megbeszélés

A genetikai polimorfizmusokra irányuló eset-kontroll vizsgálatunk jól illusztrálja az úgynevezett egyéni érzékenységi tényezők szerepét a betegségek – jelen esetben az emlőrák – kialakulásának folyamatában. Ezekre az alacsony penetranciájú tényezőkre jellemző, hogy önmagukban csak kis mértékű kockázatemelkedést okoznak, vagyis családfa-elemzéssel nem vizsgálhatók, családi halmozódást nem okoznak (X. táblázat).

	„Domináns” gén	„Hajlamosító” gén
Gyakoriság	<b>Ritka (&lt;1%)</b>	<b>Általános (&gt;1%)</b>
Vizsgálati lehetőség	<b>Családi</b>	<b>Populációs</b>
Betegség-gén viszonya	<b>Kapcsolt</b>	<b>Asszociáció</b>
Penetrancia	<b>Magas</b>	<b>Alacsony</b>
Absz. és relatív kockázat	<b>Magas</b>	<b>Alacsony</b>
Járulékos kockázat	<b>Alacsony</b>	<b>Magas</b>
Környezet szerepe	<b>Mérsékelt</b>	<b>Kritikus</b>

X. táblázat. Magas penetranciájú és egyéni érzékenység jellegű tényezők összehasonlítása

Vizsgálatunkban két tipikusan egyéni érzékenységi tényezőt – a p53 tumor szuppresszor gén és a D-vitamin receptor gén allélpolimorfizmusait – tanulmányoztunk, az emlőrák kialakulására gyakorolt hatásuk szempontjából. Eredményeink alapján a három vizsgált tényező közül kettőről (VDR *BsmI* és p53 *Arg/Pro* polimorfizmusok) bebizonyosodott, hogy kapcsolatban lehetnek a betegség kialakulásával.

A D-vitamin receptor polimorfizmusa tekintetében az irodalmi adatok sem adnak eligazítást arról, hogy ez a polimorfizmus vajon miért, milyen mechanizmussal befolyásolja a betegség kialakulásának kockázatát. A polimorfizmus ugyanis intron területére esik (a 8-as és 9-es exon közé), ezért a kódolt fehérje aminosavsorrendjét nem változtatja meg. Mivel tehát a *Bsm I* polimorfizmus a receptorfehérje szerkezetére nincs befolyással, ennek megfelelően a két allél által kódolt fehérje funkcionálisan egyenértékű, a b allél protektív hatása feltehetően az átírt mRNS stabilitásának növelésén keresztül érvényesül. Mindazonáltal a

hatásmechanizmusra vonatkozó feltételezés még nincs konkrét molekuláris biológiai – molekuláris epidemiológiai adatokkal alátámasztva.

A p53 vonatkozásában viszont már több adat ismeretes a 72-es kodon Arg/Pro polimorfizmusára, illetve a kódolt fehérjék eltérő működésére vonatkozóan. A kaukázusi populációk körében ritkább p53 allél kockázatonövelő hatása valószínűleg a polimorf helyen prolint tartalmazó fehérje kevésbé hatékony apoptózis-indukáló képességével függ össze. A *Pro* hordozó személyekben ennek megfelelően nagyobb valószínűséggel maradhatnak életben a genetikai állományukban oly mértékben sérült sejtek, melyekben a hibák kijavítása lehetetlenné vált, s melyeket a tumorképződés megakadályozása céljából eliminálni kellene. Ezzel összhangban jelen vizsgálatunk szerint is a *Pro* allélt hordozó személyek tartoznak a fokozott kockázatúak közé.

Az alacsony penetranciájú genetikai tényezők közötti kölcsönhatás érhető tetten az általunk vizsgált mintában. Míg önmagában vizsgálva mindkét polimorfizmus tekintetében a „high-risk” allélt hordozók kockázata kb. duplája a „low-risk” allélt hordozókénak, a két tényező együttes jelenlétében a mért kockázatot ötszörös nagyságú volt. Az ilyen kölcsönhatások magyarázhatják a sporadikus daganatok kialakulásának azt az epidemiológiai sajátosságát, hogy azonos expozíció mellett nem mindenki alakul ki egyformán a hatás ill. betegség. Az egyéni szintű kockázatbecslés további pontosítása újabb alacsony penetranciájú genetikai tényezők vizsgálatával lehetséges. A microarray technika elterjedésével ma már ennek a technikai feltételei adottak.

A daganatos betegségek kialakulására való hajlam pontosabb becsléséhez tehát további vizsgálatokra van szükség. Az egyéni érzékenység kialakításában résztvevő gének vizsgálata mellett a gének közötti kölcsönhatások, valamint a gén-környezet interakciók ismeretére is szükség van. Ezen összefüggések feltárására irányuló kutatások gyakorlati hasznot ígérnek. Az egyéni kockázat ismeretében bizonyos betegségek megjelenése megfelelő életmóddal, esetleg kemoprevencióval, és gyakoribb orvosi ellenőrzéssel kivédhető lenne. A távoli jövő egyik lehetősége a genotípus vizsgálata alapján történő egyéni kockázatbecslés és a személyre szabott prevenció. Ez remélhetőleg új lehetőségeket biztosít majd az emlőrák megelőzésében a jelenlegi molekuláris genetikai szűrővizsgálatok mellett, bár ekkor már újabb etikai kérdések is felvetődnek (Oláh 2003).

Egészen másfajta biomarkerekként alkalmazhatók az onko/tumor szuppresszor gének expresszió-változásai. Ezeket a pathológiai diagnosztikában már prognosztikus markerként

alkalmazzák, de a jelen dolgozatban a prevencióban való alkalmazásuk lehetőségeit próbáltuk meg tisztázni.

Sajnos a daganatok tekintetében a kurabilitás kb. 50 % Magyarországon ideális körülmények között, éppen ezért a primer prevencióra lehet és kell fókuszálni, amelynek az hatékonysága akár 25-30% lehetne. Itt is tehát a morbiditás csökkenés mellett a következményes mortalitás csökkenés volna a kívánalom. A hatékony primer prevenció szempontjából viszont nagyon fontos a molekuláris és prediktív epidemiológiai biomarkerekkel való populációsintű és egyre inkább egyéni szintű rizikóbecslés, rizikóazonosítás, már jóval a daganat kialakulása előtt. Ugyanígy nélkülözhetetlen az intervenció és hatékonyságának monitorozása megfelelő biomarkerekkel. A szűrőmódszerek mellett egyre nagyobb teret kell nyitni olyan biomarker panelek alkalmazásának amelyekkel a prevenció valamennyi szinten elősegíthető.

A kiszűrt, illetve kezelésre került betegek nagy részét áttétképzés és a szövődmények miatt veszítjük el a késői felismerés és a terápia hiányosságai folytán, hiszen míg a diagnosztika, és a patológia molekuláris irányba haladt, addig a terápia ezt kevésbé tudta követni. A metasztázisok megelőzése, ill. a citosztatikus terápia indukálta második primér daganatok megelőzése kulcsfontosságú az emlődaganatok kezelése és a betegek sorsának követése szempontjából. Kulcsfontosságú azért, a szekunder tumorok kurabilitása bonyolultabb, rövidebb lefolyásúak, több a kialakuló szövődmény, ami mind a betegre, mind az egészségügyre nagy terheket ró. Ismeretes, hogy a kemoterápiás szerek 1-5 %-ban okoznak második primér daganatot. Mindezidáig az alkilátok második tumorkeltő hatását vizsgálták a legbehatóbban, különösen haematológiai kórképekben (Non-Hodgkin lymphoma, leukémia).

Olyan új módszerek kialakítására van tehát szükség a már beváltak mellett, amelyekkel korszerű molekuláris biológiai, molekuláris epidemiológiai alapon korai, nem invazív beavatkozásokkal, majd vizsgálatokkal közelebb jutunk a veszélyeztettség felismeréséhez, sőt a diagnosztikát segítő, a páciens sorsára nézve predikciót nyújtó eredményeket kaphatunk.

Úgy tűnik, mindezen feladatokra – további részletes vizsgálatok után – megfelelőek lesznek az alkalmasan kiválasztott gének expresszióváltozásai, mint molekuláris szintű biomarkerek. A génexpresszió alapuló metodikák eddig diagnosztikus módszerként segítették a rosszindulatú daganatok elleni küzdelmet (Kopper, 2002). Előnyük, hogy ezek a biomarkerek epigenetikai hatások detektálására alkalmasak. Legfőbb hátrányuk azonban az általunk vizsgált alkalmazási lehetőséget tekintve, hogy nem eléggé specifikusak, individuális

szinten nem értékelhetők egzakt módon. Remélhetőleg hosszú távon megfelelő, betegség- vagy kockázati tényező specifikus génpanelek kidolgozása az egyéni kockázat megítélését is lehetővé teszi megoldódik. A génexpresszió-változások bár nem diagnosztikus markerek vagy szűrővizsgálatokra alkalmazható biomarkerek, azonban úgy tűnik, hogy a potenciálisan karcinogén jellegű expozíciókat, illetve ezen expozíciók korai hatását jól jelzik. Korábbi állatkísérletekben a fokozott expressziók jól korreláltak a későbbi daganatkialakulással, ami további érv ezen biomarkerek alkalmazhatósága és finomítása mellett.

Kérdéses lehet a perifériás vérből mért génexpresszió-változások oka, illetve eredete. Elvileg elképzelhető, hogy daganatsejtek jutnak a keringésbe, és az izoláláskor ezek a sejtek a fehérvérsejtekkel keveredve vezetnek átlagban magasabb expresszióhoz, de az ehhez szükséges mennyiségű daganatsejt jelenléte valószínűtlen. Lehetséges, hogy a daganat jelenléte által indukált változások (pl. jelátvivő molekulák, gyulladásos mediátorok, anyagcsere-termékek) vezetnek a perifériás vérben a sejtek megváltozott állapotához, amely a vizsgált génexpressziók révén nyomon követhető. Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a limfociták jelentős hányada repopulációs fázisban van és a hosszú életű limfociták magukon viselik az elszenvedett expozíciókat, ezáltal információt nyújtanak a szervezet többi sejtfeleségében elszenvedett expozíciók (hormonális és nem hormonális hatások, exogén expozíciók) tényéről, valamint a szervezet reparációs képességéről. Hasonló képpen a citosztatikus kezelés hatására megemelkedő gén-overexpressziók is így magyarázhatók.

A perifériás vérből mért génexpressziók terén tehát egyelőre elméleti szinten megfelelő magyarázat kidolgozására, majd annak igazolására van szükség. Ez azonban nem teszi szükségtelessé ezen biomarkerek vizsgálatát, hanem épp ellenkezőleg, az eddigi nagyon biztató eredmények fényében további vizsgálatokat kell végezni, különösen a szövettan és a stádiumok figyelembe vételével, hogy minél szélesebb körben kaphassanak helyet a daganatmegelőzés molekuláris szintű biomarkerei között.

A fenti vizsgálatok természetesen még nem primer prevenciók alkalmazások. Alapot szolgáltatott viszont ahhoz, hogy a génexpresszió-változások alkalmazásának lehetősége a primer prevencióban is felmerüljön, mivel a daganatkialakulás, a normálistól eltérő működés korai biomarkerei lehetnek.

## ***VI. Az új eredmények összefoglalása***

1. Az általunk vizsgált szubpopulációban a p53 tumor szuppresszor gén 72-es kodon polimorfizmusa szignifikánsan befolyásolta az emlőrák kialakulásának kockázatát, mégpedig a Pro allélt hordozó személyek körében magasabb volt ez a kockázat, mint az Arg allélt hordozóknál.
2. A D-vitamin receptor BsmI polimorfizmusa szintén befolyásolta az emlőrák-rizikót, a B allél bizonyult „high-risk” allélnek.
3. A két „high-risk” allél (p53 Pro és BsmI B allélek) egyidejű jelenléte a kockázatot több, mint duplájára emelte.
4. A D-vitamin receptor FokI polimorfizmusa nem volt szignifikáns hatással az emlőrák kockázatára a vizsgálat csoportban.
5. Emlőrákos betegek perifériás véréből izolált sejtekben a c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges kontrolloknál.
6. Az emlőrákos betegekben műtét után az előbbi gén-overexpressziók jelentősen csökkentek.
7. A műtét után alkalmazott CMF kemoterápiás protokoll az előbb említett expresszió-csökkenést gátolta.
7. Állatkísérletben a vizsgált szervekben (máj, lép, tüdő, vese, thymus, nyirokcsomók, csontvelő) a CMF-kezelés fokozta a 3 vizsgált gén expresszióját (a c-myc génnél a tüdő, máj és lép kivételével), vagyis a génexpresszió-változások a potenciálisan karcinogén hatású expozíció jó biomarkereinek bizonyultak.



## ***VII. Irodalom***

1. American Cancer Society: Cancer Facts & Figures – 1991, p9
2. Beckman, G., Birgander, R., Sjölander, A., és munkatársai: (1994). Is p53 polymorphism is maintained by natural selection? *Hum. Hered.* 44, 266-270.
3. Begg, L., Kuller, L.H., Gutai, J.P., és munkatársai: (1987). Endogenous sex hormone levels and breast cancer risk. *Genet Epidemiol* 4, 233-247.
4. Bhattacharjee, M., Wientroub, S., Vonderhaar, B.K. (1987). Milk protein synthesis by mammary glands of vitamin D-deficient mice. *Endocrinology* 121, 865-874.
5. Bowen, R.L., Stebbing, J., Jones, L.J.: (2006). A review of the ethnic differences in breast cancer. *Pharmacogenomics* 7, 935-942
6. Bretherton-Watt, D., Given-Wilson, R., Mansi, J.L., és munkatársai: (2001). Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Br J Cancer* 85, 171-175.
7. Broca, P.: (1866). *Influence héréditaire*. Ed, Asselin P. Paris.
8. Buyru, N., Tezol, A., Yosunkaya-Fenerci, E., és munkatársai: (2003). Vitamin D receptor gene polymorphism in breast cancer. *Experimental and Molecular Medicine* 35, 550-550.
9. Calle-Martin, O., Fabregat, V., Romero, M., és munkatársai: (1990). AccI polymorphism of the p53 gene. *Nucleic Acid Res.* 18, 4963.
10. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., és munkatársai: (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
11. Christakos, S., Raval-Pandya, M., Wernyj, R.P., és munkatársai: (1996). Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochem J.* 316 ( Pt 2):361-71.
12. Colston, K. W., Berger, U., Wilson, P., és munkatársai: (1988) Mammary gland 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor content during pregnancy and lactation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 60: 15–22.
13. Curran, J.E., Vaughan, T., Lea, R.A., és munkatársai: (1999). Association of a vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. *Int. J. Cancer* 83, 723-726.
14. Császár A, Ábel T.: (2001). Receptor polymorphisms and diseases. *Eur J Pharmacol.* 414, 9-22.
15. Danielsson, C., Mathiasen, I.S., James, S.Y., és munkatársai: (1997). Sensitive induction of apoptosis in breast cancer cells by a novel 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogue shows relation to promoter selectivity. *Journal of Cellular Biochemistry* 66, 552-562.
16. Demográfiai évkönyv, 2004. Központi Statisztikai Hivatal, 2005.
17. Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C. és munkatársai: (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33, 357-365.
18. Eccleshall, T.R., Garnero, P., Gross, C., és munkatársai: (1998). Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. *J Bone Miner Res.* 13, 31-35.
19. Egan, K.M., Newcomb, P.A., Longnecker, M.P., és munkatársai: (1996). Jewish religion and risk of breast cancer. *Lancet.* 347, 1645-1646.
20. Faraco, J.H., Morrison, N.A., Baker, A., és munkatársai: (1989). ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res.* 17:2150

21. Ford, D., Easton D.F.: (1995). The genetics of breast and ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 72. 805-812.
22. Gennari, L., Becherini, L., Mansani, R., és munkatársai: (1999): FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res.* 14, 1379-1386.
23. Graeber, A.J., Osmanian, C., Jack, T., és munkatársai: (1996). Hypoxia-mediated selectoin of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379, 88-91.
24. Harris, C., Hollstein, M.: (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New England J Medicine.* 329: 1318-1327.
25. Harris, S.S., Eccleshall, T.R., Gross, C., és munkatársai: (1997). The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res.* 12, 1043-1048.
26. Hou, M.F., Tien, Y.C., Lin, G.T., és munkatársai: (2002). Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 74, 1-7.
27. Huang, Z., Fasco, M.J., Figge, H.L., és munkatársai: (1996). Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 24, 899-905.
28. Hutchinson, P.E., Osborne, J.E., Lear, J.T., és munkatársai: (2000). Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin.Cancer Res* 6, 498–504.
29. Ingles, S.A., Garcia, D.G., Wang, W., és munkatársai: (2000). Vitamin D receptor genotype and breast cancer in Latinas (United States). *Cancer Causes and Control* 11, 25-30.
30. Ingles, S.A., Haile, R., Henderson, B., és munkatársai: (1997). Association of vitamin D receptor genetic polymorphism with breast cancer risk in African-American and Hispanic women. In: Norman, A.W., et al. (Eds.), *Vitamin D: Chemistry, Biologyand Clinical Applications of the Steroid Hormone.* University of California, Printing and Reprographics, Riverside, pp. 813–814.
31. James, S.Y., Mackay, A.G., Colston, K.W.: (1996). Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 58, 395-401.
32. Jurutka, P. W., Whit.eld, G. K., Hsieh, J. C., és munkatársai: (2001) Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2: 203–216. U.S.A. 94: 9831–9835.
33. Kampert, J.B., Whittemore, A.S., Paffenberger, R.S. Jr (1988). Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 128, 962-979.
34. Kásler, M.: (2000). Ajánlás az emlőrák korszerű diagnosztikájára, kezelésére és gondozására. *Magyar Onkológia* 44, 11–38.
35. Katz, L., Steinitz, R., Sela, T.: (1981). Epidemiological review of breast cancer in Israel. *Isr J Med Sci.* 17, 810-815.
36. Kawajiri, K., Watanabe, J., Hayashi, S.: (1996). Identification of allelic variants of the human CYP1A1 gene. *Methods Enzymol.* 272, 226-232.
37. Kopper, L., Tímár, J.: (2002). Génexpressziós profil a szolid tumorok diagnosztikájában és prognosztikájában. *Magyar Onkológia* 46, 3–9.
38. Lips, P.: (2001). Vitamin D de.ciency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 22: 477–501.

39. Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., és munkatársai: (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 250(4985):1233-8. Erratum in: *Science*. 1993 Feb 12;259(5097):878
40. Matlashewski, G., Tuck, S., Pim, D., és munkatársai: (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.* 7, 961-963.
41. Morrison, N.A., Qi, J.C., Tokita, A., és munkatársai: (1994). Prediction of bone-density from vitamin-D receptor alleles. *Nature*. 367(6460), 284–287.
42. Morrison, N.A., Yeoman, R., Kelly, P.J., és munkatársai: (1992). Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 6665-6669.
43. Murata, M., Tagawa, M., Kimura, M., és munkatársai: (1996). Analysis of a germ line polymorphism of the p53 gene in lung cancer patients; discrete results with smoking history. *Carcinogenesis*. 17, 261-264.
44. Narvaez, C.J., Welsh, J.E.: (2001). Role of mitochondria and caspases in vitamin D mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9101-9107.
45. Oláh, E.: (2003). Molekuláris genetikai szűrővizsgálatok javallatai és korlátai az onkológiában. *Focus Medicinale* 5, 33-40.
46. Oláh, E.: (2005). A BRCA1 és BRCA2 gének. *Magyar Tudomány* 8, 989-1000.
47. Ottó, Sz., Kásler, M.: (2005). A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása. *Magyar Onkológia* 49, 99–107.
48. Pim, D., Banks, L.: (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108, 196-199.
49. Powis, G., Mustacich, D., Coon, A.: (2000). The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 29, 312-322.
50. Puga, A., Nebert, D.W., McKinnon, R.A., és munkatársai: (1997). Genetic polymorphisms in human drug-metabolizing enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Crit Rev Toxicol* 27, 199-222.
51. Pujol, P., Galtier-Dereure, F., Bringer, J.: (1997). Obesity and breast cancer risk. *Hum. Reprod.* 12 Suppl 1, 116-125.
52. Ries, L.A.G., Hankey, B.F., Edwards, B.K.: (1990). *Cancer Statistics Review 1973-87*. NIH publication No 90-2789, Bethesda, Md, Division of Cancer Prevention and Control, National Cancer Institute.
53. Ruggiero, M., Pacini, S., Aterini, S., és munkatársai: (1998). Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncol Res.* 10, 43-46.
54. Sant, M., Aareleid, T., Berrino, F., és munkatársai: (2003). EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol.* 14 Suppl 5:v61-118.
55. Simboli-Campbell, M., Narvaez, C.J., VanWeelden, K., és munkatársai: (1997). Comparative effects of a  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 cells. *Breast Cancer Research Treatment* 42, 31-41.
56. Srivastava, A.K.: (1990). Non-receptor protein tyrosine kinases of normal tissues. *Int. J. Biochem.* 22(11):1229-34.
57. Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., és munkatársai: (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229-234.
58. Suspitsin, E.N., Buslov, K.G., Grigoriev, M.Y., és munkatársai: (2003). Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int J Cancer* 103, 431-433.
59. Valdivielso, J.M., Fernandez, E.: (2006). Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta.* 371, 1-12.

60. Wang-Gohrke, S., Becher, H., Kreienberg, R., és munkatársai: (2002). Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 12, 269-272.
61. Welsh, J., Wietzke, J.A., Zinser, G.M., és munkatársai: (1994). Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J. Nutr.* 133(7 Suppl):2425S-2433S.
62. Welsh, J.E., Wietzke, J.A., Zinser, G.M., és munkatársai: (2003). Impact of the vitamin D<sub>3</sub> receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 85-92.
63. Wong, H.L., Seow, A., Arakawa, K., és munkatársai: (2003). Vitamin D receptor start codon polymorphism and colorectal cancer risk: effect modification by dietary calcium and fat in Singapore Chinese. *Carcinogenesis* 24, 1091-1095.
64. Yang, X., Young, L.H., Voigt, J.M.: (1998). Expression of a vitamin D regulated gene (VDUP-1) in untreated and MNU-treated rat mammary tissue. *Breast Cancer Res Treat* 48, 33-44.
65. Ye, W.Z., Reis, A.F., Velho, G.: (2000). Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J Hum Genet*;45(1):56–7.
66. Zinser, G., Packman, K., Welsh, J.: (2002). Vitamin D(3) receptor ablation alters mammary gland morphogenesis. *Development*. 129(13):3067-76.

## ***Dr. Faluhelyi Zsolt saját közleményei:***

Ember, I. Kiss, Zs. Faluhelyi:

Gene expression changes as potential biomarkers of tumor bearing status in human.  
European Journal of Cancer Prevention, 1998,7,347-350,  
imp.f.: 0,853

Faluhelyi Zs., Rodler I., Csejtey A., Tyring SK., Ember I.A., Arany I.: All-trans retinoic acid (ATRA) suppresses transcription of human papillomavirus type 16 (HPV16) in dose-dependent manner  
Anticancer Research 24:807-810 (2004)  
imp.f.: 1,395

Zs. Faluhelyi, Á. Németh, I. Ródlér, A. Csejtey, A. Kvarda, L. Bujdosó:

CMF treatment-induced changes of gene expression in peripheral leukocytes of breast cancer patients.

Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine  
2004;10(2):184-188  
imp.f.: -

Á. Németh, E Nádas, A. Beró, L. Olasz, Á. Ember, A. Kvarda, L. Bujdosó, I. Arany, A. Csejtey, Zs. Faluhelyi, I. Ember:

Early effects of Transplatin on oncogene activation in vivo  
Anticancer Research 24:3997-4002 (2004)  
imp. f.: 1,347

I. Kiss, Á. Németh, B. Bogner, G. Pajkos, Zs. Orsós, J. Sándor, A. Csejtey, Zs. Faluhelyi, I. Rodler, I. Ember:

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

### Idézhető előadás kivonatok

- A. Tibold, I. Kiss, I. Ember, A. Csejtey, Zs. Faluhelyi:  
Association between XRCC1 polymorphism and head and neck cancer, and thyroid cancer  
Cancer Detection and Prevention  
7<sup>th</sup> International symposium on predictive oncology & intervention strategies  
Nice, France 7-10 february 2004
- I. Ember, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bújdosó, Á. Ember, Á. Németh, A. Csejtey, G. Nowrasteh, T. Varjas:  
Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer  
VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu  
Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3480  
imp. f.: 1,347
- Á. Ember, Á. Németh, Cs. Varga, Zs. Faluhelyi, A. Csejtey, J.L. Iványi, I. Kiss, N. Ghodrattollah, K. Fehér, N. Kékes, Zs. Dombi, I. Arany, I. Ember:  
Investigation on the expression of onco/suppressor genes as predictive biomarkers for breast cancer patients  
VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu  
Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3479  
imp. f.: 1,347
- 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  
Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3483  
imp. f.: 1,347
- I. Kiss, Zs. Orsós, A. Csejtey, R. Schnabel, Zs. Faluhelyi, B. Bogner, J. Sándor, Á. Németh, I. Ember:  
Allelic Polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer  
VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu  
Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3536  
imp. f.: 1,347
- T. Varga, Zs. Orsós, Zs. Faluhelyi, A. Csejtey, I. Ember, I. Kiss:  
Effect of allelic polymorphism of p53 tumor suppressor gene and vitamin-D receptor gene on individual susceptibility to breast cancer  
VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu  
Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3663  
imp. f.: 1,347
- Csejtey A., Tibold A., Koltai K., Faluhelyi Zs., Kiss I., Ember I.:  
Allélpolimorfizmusok, mint a kolorektális tumor rizikó módosító tényezők  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.  
Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:34

Faluhelyi Zs.: Génexpresszió, mint az emlőrák terciér prevenciójának molekuláris markere  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.  
Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:38

Faluhelyi Zs., Tibold A., Koltai K., Csejtei A., Kiss I., Ember I.:  
Összefüggés az XRCC1 polimorfizmus és a pajzsmirigy daganatok között  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.  
Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:39

Molnár F.T., Kiss I., Faluhelyi Zs., Orsós Zs., Bujdosó L.:  
Onkogén és tumor szupresszor gén expresszió a tüdőrákos betegek különböző szöveiben  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.  
Magyar Epidemiológia Supplementum, II. évfolyam 1. szám 2005 pp:58

### **Könyvfejezetek:**

Fehér K., Kiss I., Sándor J., Faluhelyi Zs., Csejtei A., Ember I.:

Tüdőtumorok (72-87.o.)

In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája

Szerk.: Ember I., Kiss I.

Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005

Németh K., Kiss I., Rodler I., Csejtei A., Faluhelyi Zs., Ember I.:

Vastagbél-és végbélrák (88-101.o.)

In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája

Szerk.: Ember I., Kiss I.

Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005

Kiss I., Kiss A., Sándor J., Faluhelyi Zs., Ember I.:

Emlórák (102-108.o.)

In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája

Szerk.: Ember I., Kiss I.

Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005

Tóth T., Kiss A., Faluhelyi Zs.:

Ovarium carcinoma (145-151.o.)

In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája

Szerk.: Ember I., Kiss I.

Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest 2005



## **Magyar előadások**

Varga T., Orsós Zs., Faluhelyi Zs., Csejtey A., Ember I., Kiss I.:

A p53 tumor szuppresszor gén és a D-vitamin receptor gén allélpolimorfizmusainak hatása az emlőrák iránti egyéni érzékenységre

NETT XIII. nagygyűlése

Szekszárd, 2004. május 6-8.

Kiss I., Orsós Zs., Csejtey A., Faluhelyi Zs., Varga Zs., Pázsit E., Ember I.:

DNS repair gének SNP-ainak hatása a colorectalis daganat előfordulás kockázatára

Magyar Higiénikusok Társasága XXXVI. vándorgyűlése

Siófok, 2006. október 3-5.

## **Nemzetközi előadások:**

Faluhelyi Zs., Varga Cs., Gyöngyi Z., Ember I.:

A perifériás vérből nyerhető molekuláris epidemiológiai biomarkerek (Poszter)

Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság I. Kongresszusa

Pécs, 2003. November 28-29.

G. Nowrasteh, Zs. Faluhelyi, A Csejtey, A. Kvarda, L. Bujdosó, I. Ember, I. Arany: All-trans Retinoic Acid (ATRA) suppresses growth of cervical carcinoma cells in a dose-dependent manner

Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság I. Kongresszusa

Pécs, 2003. November 28-29.

A. Tibold, I. Kiss, I. Ember, Zs. Faluhelyi:

Association between XRCC1 polymorphism and head and neck cancer, and thyroid cancer

Predictive oncology & intervention strategies

(Molecular Basis of Oncogenesis & Cancer Control)

Nice, France 7-10 february, 2004

A. Csejtey, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, I. Ember:

Allelic polymorphism as modifiers of colorectal cancer risk

AACR 95<sup>th</sup> Annual Meeting

Orlando, Florida, March 27-31, 2004

A. Csejtey, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bujdosó, Á. Németh, I. Ember:

Early detection of carcinogen exposures: an animal model using in vivo gene expressions as biomarkers

ISAC XXII International Congress

Montpellier, France 22-27 May 2004

- A. Tibold, I. Kiss, I. Ember, A. Csejtei, Zs. Faluhelyi:  
 The XRCC1 polymorphism and relation with thyroid cancer  
 Second International Conference on Rural Health &  
 First International Conference on Occupational and Environmental Health  
 in Mediterranean, South East, and Central European Countries  
 Belgrade, Serbia and Montenegro. May 26-29, 2004
- A. Csejtei, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bujdosó, Á. Németh, I. Ember :  
 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 3-6 July 2004
- I. Kiss, B. Bogner, A. Csejtei, Zs. Faluhelyi, Á. Németh, J. Sándor, Zs. Orsós, G. Pajkos, I.  
 Ember:  
 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 3-6 July 2004.
- I. Ember, I. Kiss, Zs. Faluhelyi, A. Csejtei, P. Gergely, B. Kádár, E. Pázsit:  
 A new “risk assessment” software in the primary prevention of cancer  
 European School of Oncology  
 Advanced School  
 Grand Canaria, maj. 17. 2004.
- I. Ember, I. Kiss, T. Varjas, G. Nowrasteh, L. Bujdosó, A. Kvarda, Zs. Faluhelyi, A. Csejtei,  
 Á. Ember, Á. Németh, E. Pázsit, Gy. Czakó, P. Gergely:  
 In vivo gene expression system is a good biomarker of chemopreventive agents  
 16<sup>th</sup> Pezcoller Symposium  
 Trento, Italy 10-13 jun. 2004
- A. Csejtei, A. Tibold, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, I. Ember:  
 The role of allelic polymorphism in colorectal cancer risk  
 European Environmental Mutagen Society 34<sup>th</sup> Annual Meeting  
 EEMS 2004, Sept 4-8 Maastricht, The Netherlands
- I. Ember, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bujdosó, Á. Ember, Á. Németh, A. Csejtei, G.  
 Nowrasteh, T. Varjas:  
 Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer  
 VII. International Conference of Anticancer Research  
 Corfu, Greece October 25-30, 2004
- Á. Ember, Á. Németh, Cs. Varga, Zs. Faluhelyi, A. Csejtei, J.L. Iványi, I. Kiss, N.  
 Ghodrattollah, K. Fehér, N. Kékes, Zs. Dombi, I. Arany, I. Ember:  
 Investigation on the expression of onco/suppressor genes as predictive biomarkers for  
 breast cancer patients  
 VII. International Conference of Anticancer Research  
 Corfu, Greece October 25-30, 2004

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

I. Kiss, Zs. Orsós, A. Csejtey, R. Schnabel, Zs. Faluhelyi, B. Bogner, J. Sándor, Á. Németh, I. Ember:  
Allelic Polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of colorectal cancer  
VII. International Conference of Anticancer Research  
Corfu, Greece October 25-30, 2004

T. Molnár, I. Kiss, Zs. Faluhelyi, A. Csejtey, A. Kvarda, L. Bujdosó, Á. Németh, E. Pázsit, I. Ember:  
Expression of onco/tumor suppressor genes in lung cancer patients  
VII. International Conference of Anticancer Research  
Corfu, Greece October 25-30, 2004

T. Varga, Zs. Orsós, Zs. Faluhelyi, A. Csejtey, I. Ember, I. Kiss:  
Effect of allelic polymorphysm of p53 tumor suppressor gene and vitamin-D receptor gene on individual susceptibility to breast cancer  
VII. International Conference of Anticancer Research  
Corfu, Greece October 25-30, 2004

Csejtey A., Tibold A., Koltai K., Faluhelyi Zs., Kiss I., Ember I.:  
Allélpolimorfizmusok, mint a kolorektális tumor rizikó módosító tényezői  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

Faluhelyi Zs.:  
Génexpresszió, mint az emlőrák terciér prevenciójának molekuláris markere  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

Faluhelyi Zs., Tibold A., Koltai K., Csejtey A., Kiss I., Ember I.:  
Összefüggés az XRCC1 polimorfizmus és a pajzsmirigy daganatok között  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

Molnár F.T., Kiss I., Faluhelyi Zs., Orsós Zs., Bujdosó L.:  
Onkogén és tumor szupresszor gén expresszió a tüdőrákos betegek különböző szöveteiben  
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság  
II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2.

- I. Kiss, Zs. Orsós, Zs. Faluhelyi, Á. Ember, A. Csejtei, B. Kadar, P. Gergely, A. Tibold, I. Ember:  
Colorectal cancer risk in relation to polymorphisms of the XRCC1 and p53 genes  
19th meeting of the EACR  
Budapest, 1-4 July 2006
- Zs. Faluhelyi, T. Varga, Zs. Orsós, E. Pázsit, K. Molnár, I. Prantner, A. Tettinger, I. Ember, I. Kiss:  
Influence of allelic polymorphisms of vitamin D receptor and p53 tumor suppressor gene on the risk of breast cancer  
19th meeting of the EACR  
Budapest, 1-4 July 2006
- Zs. Orsós, J. Béres, Zs. Faluhelyi, A. Kvarda, T. Varjas, N. Ghodrattollah, Zs. Dombi, E. Pázsit, I. Ember, I. Kiss:  
Distribution of p53 tumor suppressor gene codon 72 alleles in Hungary: comparison between Roma (Gipsy) and non-Roma populations  
19th meeting of the EACR  
Budapest, 1-4 July 2006
- I. Kiss, Zs. Orsós, A. Csejtei, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Ember:  
Single nucleotide polymorphism in DNA repair genes affect the risk of colorectal cancer  
11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine  
Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006.
- Zs. Orsós, J. Béres, A. Csejtei, Zs. Faluhelyi, I. Ember, I. Kiss:  
Allelic polymorphism of XRCC1 DNA repair gene in the Hungarian Roma (Gipsy) population  
11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine  
Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006.
- A. Csejtei, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Faluhelyi, Zs. Orsós, I. Kiss, I. Ember:  
Allelic polymorphisms as modifiers of colorectal cancer risk  
11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine  
Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006.

## ***Köszönetnyilvánítás***

Ezúton szeretném megköszönni minden munkatársam türelmét és segítségét, amellyel lehetővé tették, hogy a napi feladatok mellett időt és energiát fordíthassak a disszertációm elkészítésére.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Ember István Professzor Úrnak és a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet munkatársainak a disszertációmhoz nyújtott önzetlen segítségért:

Dr. Kiss Istvánnak,  
Orsós Zsuzsának  
Brunnerné Bayer Zsuzsának  
Herceg Mónikának.

Köszönöm családomnak, hogy munkámhoz nyugodt háttérrel nyújtottak.