

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

***Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei***

***Dr. Faluhelyi Zsolt***

***Programvezető: Dr. Ember István***

***Témavezető: Dr. Kiss István***

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

***Pécs, 2007.***

## **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. Hazánkban az elmúlt 50 évben az emlőrákos mortalitás 2001-ig az első helyen állt a női daganatos halálokok között.

Az úgynevezett örökletes emlőrákok az emlőrákos megbetegedések 5-9%-át teszik ki. Az emlőrákok 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.

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

A sporadikus emlőrákok kialakulásában a környezeti kockázati tényezőkön 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 karcinogénnel metabolizáló enzimek számos polimorfizmusa rizikófaktorként jelenik meg a humán karcinogenezisben, így az emlőrák kialakulásában is. Fontos szerepük van továbbá a hormonmetabolizmusban résztvevő enzimek génjeinek, 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<sub>3</sub>-vitamin központi szerepet tölt be a kalcium-háztartásban, a csontosodás metabolizmusában, ezen kívül hatással van a proliferáció, a differenciáció és a programozott sejthalál folyamatára is, mind a normál, mind a transzformálódott sejtekben. 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. 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.

Mivel a D-vitamin hatását receptorán keresztül fejti ki, a D-vitamin-receptor funkciója ugyancsak lényeges tényező lehet az emlőrák-iránti egyéni érzékenység befolyásolásában.

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

A D-vitamin receptorát megtalálhatjuk az emlőszövet főbb sejtjeitípusaiban (bazális és lüminális epithelsejtek, „cap” sejtek, stroma-sejtek), de expressziója sejtípusonként valamint időben is változó. A VDR kifejeződésének dinamikus szabályozása az 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> funkcionális szerepét sejteti az emlő fejlődésében. A VDR génje ráadásul polimorf, a humán D-vitamin-receptornak többféle allélje ismeretes.,

#### *VDR polimorfizmusok:*

Az 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> szteroid hormon fontos protektív szerepet tölt be a sporadikus emlőrások kialakulásában. Hatását azonban csak receptorán keresztül fejtheti ki, mely egy transzkripciós faktort kódol. A VDR génben pontmutáció következtében létrejövő genetikai módosulások súlyos génaktivációs defektust okozhatnak, így magától értetődő, hogy a D-vitamin tumorsejtek proliferáció gátlásának hatékonyságában VDR gén polimorfizmusainak rendkívül fontos szerepe van.

Ha a pontmutáció olyan pozícióban történik, ahol éppen egy restriktív 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 restriktív fragment-hossz polimorfizmusoknak nevezzük (RFLP). A D-vitamin receptor több restriktív fragment-hossz polimorfizmusa ismert az irodalomban, pl. *Tru9I*, *TaqI*, *BsmI*, *EcoRV* és *ApaI*.

#### *BsmI polimorfizmus:*

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

#### *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, vastagbélrák és emlőrák esetében. Más eredmények szerint a sporadikus emlőrák és a *FokI* polimorfizmus kapcsolatában viszont nem mutatható ki szignifikáns összefüggés.

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

A p53 tumorszuppresszor gén az egyik legintenzívebben tanulmányozott humán gén. Genomkárosodás esetén a p53 protein felhalmozódik a sejtben, elősegíti a p21 fehérje transzkripcióját, és G1 fázisban leállítja a sejtciklust 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.

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

A p53 tumorszuppresszor gén mutációja a humán daganatok 50%-ban kimutatható. 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.

## I.2. A prevenció szerepe

Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben rohamos fejlődésének indult a daganatterápia, néhány tumor kivételével fenntartások nélkül még mindig nem jelenthetjük ki, hogy „a daganatok gyógyítható betegségek”. A daganatterápia ráadásul igen költséges, az utóbbi években kifejlesztett gyógyszerek nagyon drágák. Ezt 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 prevenció erősítésnek tekinthetünk az emlőrák esetében minden olyan erősítést, amely az ösztrogén-expozíció mérséklésére irányul, illetve további kockázati tényezők (pl. dohányfüstből származó karcinogének) elkerülését célozza.

A prevenció eszköze a kockázatbecslés is (ennek részeként a fokozott kockázatú csoportok azonosítása), amely pontosításának, továbbfejlesztésének egyik lehetősége az alacsony penetranciájú genetikai tényezők figyelembe vétele. Az értekezés két ilyen alacsony penetranciájú tényező vizsgálatát tűzte célul, amelyek a p53 tumor szuppresszor gén illetve a D-vitamin receptor gén allélpolimorfizmusai.

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 transzkripciós regulátorként DNS-szintézist indukálva transzformált sejt kialakulását is okozhatja. A c-myc overexpresszióját írták le számos daganatban, illetve transzformált sejtekben, sejtvonalakban.

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 a jelátviteli kaszkád kezdeti részében működnek, a sejtmembrán belső felületéhez kötötten. A kaszkádok végső effektorai a sejtmagban levő transzkripciós 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 **p53** tumor szuppresszor gén 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 transzkripciós 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.

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 kezelésekkel

kapcsolatban fontos, hogy pontosan ismerjük a daganat biológiai tulajdonságait, és ehhez, valamint a várható prognózishoz igazítsuk a kezelést.

A mellékhatások, szövődmények (például az esetleges szekunder tumorok kialakulása) megbízható mérése, illetve előrejelzése egyelőre nem megoldott. Előre 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 kialakulásának 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 génekre 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**

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 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)  
ATGCCAGAGGCTGCTCCCC (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.

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

- **A VDR polimorfizmusok vizsgálata**

A VDR gén polimorfizmusainak vizsgálatához PCR-RFLP (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus) módszert alkalmaztunk.

- ***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 lánreakcióhoz a következő primereket használtuk: 5'-

CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'

5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'

*RFLP:* A PCR segítségével amplifikált 825 bp hosszú DNS-fragmentet ezután *BsmI* restrikciós enzimmel való emésztésnek vetettük alá, majd ezt követően a minták teljes mennyiségét ethidium-bromiddal festett 1,5%-os agaróz gélen futtattuk.

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.

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

5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT -3'

5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC -3'

*RFLP*: A PCR segítségével felszaporított 265 bp hosszú DNS-fragmentet ezután *FokI* restriktív enzimmel való emésztésnek vetettük alá, majd ezt követően a minták teljes mennyiségét ethidium bromiddal festett 2%-os agaróz gélen futtattuk.

A *FokI* 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.

## 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 expresszáló  $\beta$ -aktin génnel rehibridizáltuk. A keletkező kemilumineszcens jelet röntgenfilmen fogtuk fel, melyet előhívás után HP DeskScan IIC típusú szkennelvel számítógépbe vittük, és a denzitásokat Quantiscan 2.0 (Biosoft) programmal értékeltük.

## 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 I. táblázat mutatja a beteg és a kontroll csoportban.

	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%)

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

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 (II. táblázat).

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

II. 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 III. 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%)

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

A *FokI* polimorfizmus esetében a kontroll csoport genotipizálásával kapott alléleloszlások nem térnek el jelentősen az európai nők körében végzett vizsgálatok eredményeitől. A *BsmI* polimorfizmust vizsgálva a B allél gyakorisága a kontroll populációban 43%-nak bizonyult. A VDR polimorfizmusok és az emlőrákos megbetegedések közötti kapcsolatot vizsgálva a következő eredményeket kaptuk az adatok elemzéséből (IV. 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>

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

Az irodalmi adatok alapján az FF genotípus emlőrák kialakulásával szemben mutatkozó 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 V. 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</i> BB	51 (25,5%)	29 (14,5%)	<u>2,02</u>	<u>1,18-3,46</u>
<b><i>P53 Pro</i> hordozó+ <i>BsmI</i> BB</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>

V. 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

csoporthoz, 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>	21 (41,2%)	22 (75,9%)
<i>Arg/Pro</i>	23 (45,1%)	7 (24,1%)
<i>Pro/Pro</i>	7 (13,7%)	—

VI. 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.

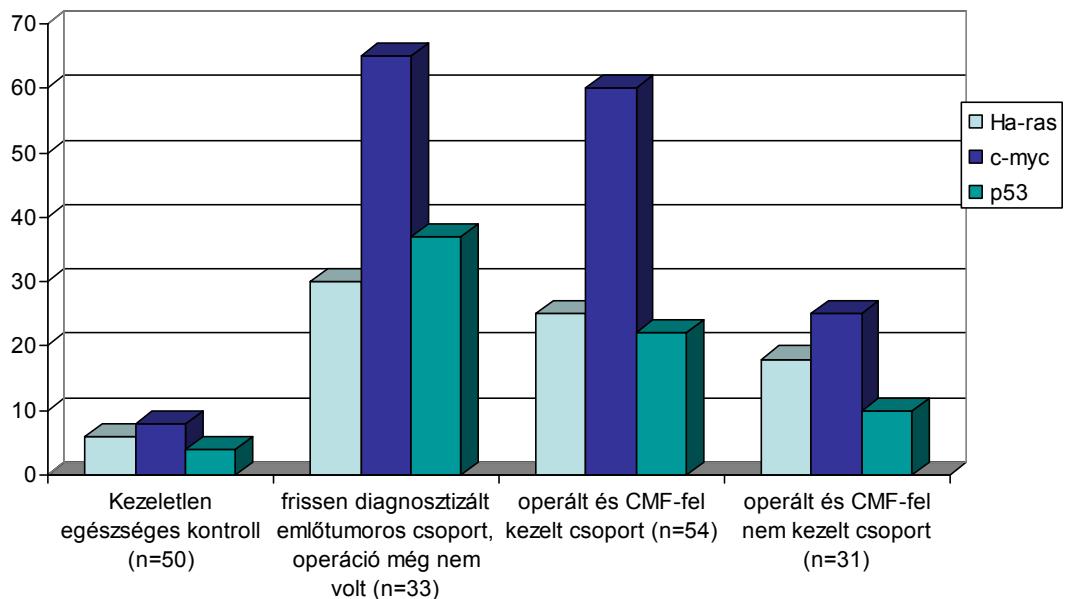
Míg tehát a kontroll csoport BB homozigótái p53 genotípusukat tekintve túlnyomó többségükben (76%) *Arg* homozigóták, kisebb részben (24%) *Arg/Pro* heterozigóták, addig a beteg csoportban az *Arg* homozigóták aránya (41%) lecsökken, s a BB genotípushoz többnyire egy (45%), vagy kettő (14%) *Pro* allél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

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 1. ábrán láthatók.



1. 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.

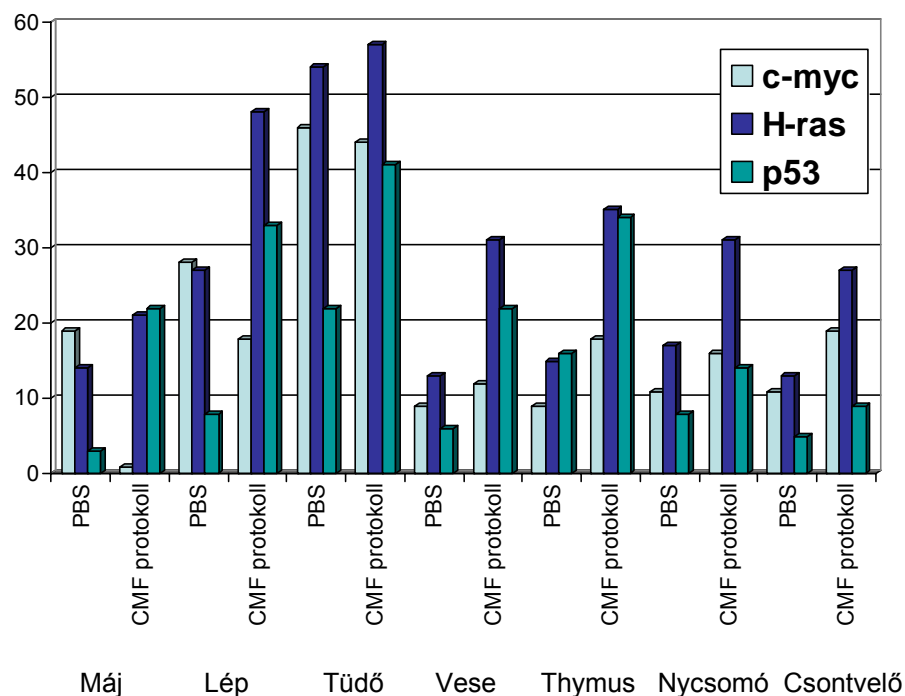
Végül a műtét után CMF kezelésben is részesült betegek körében minimális csökkenés volt tapasztalható a frissen diagnosztizált csoporthoz viszonyítva.



Ha az utóbbi két csoportot vesszük 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 2. ábra mutatja.



2. 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 fiziológiás 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***

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 adóttak.

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 patológiai 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 populációsztű 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 veszélyeztetettség 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, gyulladáshoz vezető 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 elszennvedett expozíciókat, ezáltal információt nyújtanak a szervezet többi sejtjében elszennvedett 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 prevenciós alkalmazások. Alapot szolgáltatnak 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” allélnak.
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.

***Dr. Faluhelyi Zsolt 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

Á. Németh, E. Nádasi, 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. Bujdosó, 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. Ródlér, 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. Csejtej, 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. Anticancer Research Vol.24, Number 5D, September-Oktober 2004 pp:3663.imp. f.: 1,347

Csejtej 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. 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., Csejtej 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 szöveteiben. 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., Csejtej 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., Csejtej 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.: Emlőrák (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

### **Előadások száma: 29**