

**Allélpolimorfizmusok, mint a kolorektális és fej-  
nyaki tumorok kialakulásának és lefolyásának  
biomarkerei**

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Dr. Csejtei András**

*Programvezető: Dr. Ember István*

*Témavezető: Dr. Kiss István*

*Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Népegészségtani Intézet*

*Pécs, 2010*

## BEVEZETÉS:

A kolorektális daganatok világszerte az egyik leggyakoribb daganatos halálokot képezik. A WHO becslése szerint több, mint egy millió új kolorektális daganatos megbetegedést regisztrálnak évente, melynek valamivel kevesebb, mint fele végződik halállal a nyugati országokban. A 100.00 főre eső nyers halálozás Magyarországon 2007-ben férfiaknál 54,9, nőknél 40,9 volt (KSH, 2008) amellyel e daganattípus a hazai daganatos mortalitási ranglista második (a tüdőrák után) helyén állt mindkét nem esetében.

A sporadikus kolorektális daganatok kialakulásának külső kockázati tényezőit (pl. táplálkozási tényezők fizikai inaktivitás, dohányzás) ma már meglehetősen jól ismerjük. A külső rizikófaktorok hatásait különböző genetikai tényezők befolyásolják, a karcinogén hatás mindig a környezeti és genetikai tényezők kölcsönhatásának lesz az eredménye.

A kolorektális daganatoknál ilyen genetikai tényezők lehetnek a szervezetünkbe jutó vegyületeket metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai. A karcinogén anyagok többsége ugyanis úgynevezett prokarcinogénként kerül szervezetünkbe, majd a metabolizáló enzimek által katalizált átalakulás után válik definitív karcinogénné. A karcinogén expozíció mellett tehát metabolizáló enzimjeink aktivitása és a metabolizáló folyamatok sebessége befolyásolja a karcinogének szervezeten belüli koncentrációját, illetve behatási idejét, így a daganatkialakulás kockázatát is. Metabolizáló enzimjeink döntő többsége pedig genetikailag polimorf, azaz többféle allélvariánsa van, amelyek befolyásolják az általuk kódolt enzimek aktivitását.

A glutation-S-transzferáz (GST) enzimek a szervezetünkbe jutott, aktív karcinogén vagyületek detoxifikálásáért felelősek. Funkciójuk a glutationnal való konjugáció, amely során a szervezetben levő toxikus és karcinogén molekulák vízoldékonyvá és ezáltal könnyen eltávolítható metabolitokká alakulnak át. Az enzimcsalád legismertebb tagja a glutation-S-transzferáz M1 (GSTM1), melynek legfontosabb szubsztrátjai a policiklusos aromás szénhidrogének. Az enzimet kódoló gén fontos polimorfizmusa az úgynevezett 0/+ polimorfizmus. A 0 genotípus a GSTM1 gén területén levő homozigóta deléció következtében jön létre, azaz a GSTM1 0 genotípusú egyéneknek nincs működőképes GSTM1 enzimjük. Hasonló inzerciós/deléciós polimorfizmusa létezik a GST enzimcsalád egy másik tagjának, a glutation-S-transzferáz T1 enzimnek. Mivel a GSTM1 és GSTT1 null genotípusú személyek nem rendelkeznek funkcióképes enzimmel, ezért ők kisebb

mértékben képesek a szervezetünkben levő aktív karcinogéneket detoxifikálni, így eme elektrofil vegyületek DNS-adduktokat képezhetnek, és a daganat-kialakulás kockázata náluk feltehetően magasabb lesz. A genotípus és a daganatrizikó kérdésének vizsgálatán túl az utóbbi években többen vizsgálták azt is, hogy a beteg genotípusa befolyásolja-e a már kialakult daganat biológiai sajátosságait, agresszivitását, a metasztázis-képződést és mindazon faktorokat, melyek szerepet játszanak a betegség prognózisának alakításában. Lehetnek-e a metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai prognosztikus markerek?

A daganatok iránti egyéni érzékenységet nem csupán a metabolizáló enzimek, hanem számos egyéb genetikai tényező is befolyásolhatja, például tumorszuppresszor gének allélpolimorfizmusai. A tumorszuppresszor gének a sejtproliferáció negatív szabályozói. Jellegzetes képviselőjük az egyik legintenzívebben tanulmányozott humán gén, a 17-es kromoszómán elhelyezkedő p53 gén. Polimorfizmusai közül a legjelentősebbet a 4-es exon területén, a 72-es kodonban találjuk, ahol egy guanin→citozin szubsztitúció hatására a fehérje aminosavszerkezete is módosul. A fehérje kémiai-biokémiai tulajdonságai kisebb mértékben változnak. A két protein apoptózist indukáló képességében is különbözik; az Arg allél kinetikája valamivel gyorsabb, hatékonyabban indukál apoptózist, mint a Pro allél. A p53 *Arg/Pro* polimorfizmusa nagy etnikai heterogenitást mutat, és feltételezések szerint ugyancsak befolyásolhatja a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatát.

Az utóbbi évtizedekben a fej-nyaki daganatok okozta halálozások száma egyre nő. Hazánkban a XX. század második felében férfiaknál tízévente majdnem megduplázódtak a fej-nyaki daganatos halálozások. A vastagbéldaganatokhoz hasonlóan a WHO halálozási listáján az első helyen álltunk mind férfiak mind nők esetén az ajak- szájüreg- és garat daganatai közt.

A fej-nyaki régió daganatait tekintve az örökletes daganatok vagy daganatos szindrómák ritkák, a betegség megjelenéséért szinte teljes mértékben az életvitelünk felelős. Legfőbb befolyásolható kockázati tényezők a dohányzás és az alkoholfogyasztás. Mint minden olyan betegség esetén, mely kialakulásában a környezeti tényezők szerepe jelentős, a fej-nyaki daganatok kialakulásában szintén fontos szerepe van az egyéni érzékenységnek, amit viszont nagy mértékben genetikai tényezők határoznak meg. A fej-nyaki daganatok kockázatát befolyásoló genetikai faktorok közé tartozhatnak többek között olyan gének allélpolimorfizmusai, amelyek részt vesznek a DNS-ben keletkezett hibák kijavításában.

Az egyik ilyen gén, az X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) gén a 19-es kromoszómán helyezkedik el, szerepet játszik az egyes szálú lánc-törések javításában és a báziskivágásos repairban, így például részt vesz az ionizáló sugárzások és alkiláló szerek által okozott lánc-törések javításában. Ilyen DNS-károsodások keletkeznek még tipikusan az endogén felszabaduló oxidatív molekulák illetve számos karcinogén anyag hatására is.

Az XRCC1 génnek 5 polimorfizmusát írták le, melyből három esetben a kódolt fehérje aminosav sorrendje is megváltozik. Ez a három allélpolimorfizmus a 194-es kodon, a 280-as kodon és a 399-es kodon területén található. A 194-es kodon esetében C-T báziscsere révén arginin/triptofán (Arg/Trp), a 280-as kodon esetében G-A polimorfizmus kapcsán arginin/hisztidin (Arg/His), a 399-es kodon esetében pedig ugyancsak G-A szubsztitúció miatt arginin/glicin (Arg/Gln) módosulás történik a fehérjében. Az XRCC1 polimorfizmusainak pontos szerepe még nem tisztázott, de az eddigi adatok arra utalnak, hogy a megváltozott aminosav sorrend befolyással van a fehérje funkciójára. Az Arg399Gln polimorfizmus a poli(DNS-ribóz)polimeráz kötő domén területére esik, és valószínűleg a Gln-allélt hordozók repair-kapacitása valamivel gyengébb, mint az Arg allélt hordozóké.

Az XRCC1 mutációt hordozók sokkal érzékenyebbek az ionizáló sugárzásokkal szemben illetve gyakoribb testvérkromatida-kicserélődést mutatnak, így feltehető, hogy a polimorfizmusok kapcsán megváltozott XRCC1 funkció is összefüggésben állhat a daganatkialakulás fokozott kockázatával. Az utóbbi években ugyancsak felmerült, de még igen kevésbé vizsgált kérdés, hogy az XRCC1 allélpolimorfizmusok prognosztikus értékűek-e a fej-nyaki régió daganataiban szenvedő betegeknél..

## **CÉLKITŰZÉSEK:**

- A GSTM1 és GSTT1 0/+ allélek megoszlása különbözik-e kolorektális daganatos betegek és egészséges kontrollok között (befolyásolják-e a GSTM1 és T1 allélpolimorfizmusok a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatát)?
- A p53 tumor szuppresszor gén 72-es kodon Arg/Pro allélek megoszlása különbözik-e kolorektális daganatos betegek és egészséges kontrollok között (befolyásolja-e a p53 72-es kodon Arg/Pro allélpolimorfizmusa vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatát)?

- Különbözik-e egymástól az egyes GSTM1, GSTT1 illetve p53 alléleket hordozó kolorektális daganatos betegek átlagos túlélése (befolyásolják-e a vizsgált allélpolimorfizmusok a kolorektális daganatok prognózisát)? Különbözik-e a vizsgált allélpolimorfizmusok hatása a különböző stádiumban diagnosztizált daganatok esetén?
- Az XRCC1 194-es és 399-es kodon és alléljeinek megoszlása különbözik-e fej-nyaki daganatos betegek és egészséges kontrollok között (befolyásolják-e az XRCC1 allélpolimorfizmusok a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatát)?
- Különbözik-e egymástól a különböző XRCC1 alléleket hordozó fej-nyaki daganatos betegek átlagos túlélése (befolyásolják-e a vizsgált allélpolimorfizmusok a fej-nyaki daganatok prognózisát)? Különbözik-e a vizsgált allélpolimorfizmusok hatása a különböző stádiumban diagnosztizált daganatok esetén?

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK:**

### **A betegek kiválasztása, klinikai háttér:**

Vizsgálatunk első részéhez (vastag- és végbéldaganatok) a Vas Megyei Markusovszky Kórház (Szombathely) kolorektális daganatos beteganyagát és adatbázisát használtuk fel. A betegeket a Dukes kritériumok alapján csoportosítottuk, és a különböző Dukes szerinti stádiumokba sorolható betegeket külön-külön csoportokban vizsgáltuk. A résztvevők nem szerinti megoszlása az alábbi volt: 127 férfi és 55 nő. A betegek átlag-életkora  $63,4 \pm 6,4$  év volt. Szövettanilag valamennyi eset adenokarcinómának bizonyult.

A fej-nyaki daganatban szenvedő páciensek anyagai ugyancsak a Vas Megyei Markusovszky Kórház Onkológiai és Patológiai osztályának archívumából származnak. Szövettanilag planocelluláris karcinóma az összes vizsgált anyag. A TNM státusz alapján az American Joint Committee on Cancer (AJCC) ajánlását nyomon követve S 0-IV stádiumokba soroltuk a pácienseket. Az összesen 189 páciens közül 163 volt férfi, míg a nők száma 26 volt. A betegek átlagos életkora  $57,6 \pm 8,1$  év volt. Az utánkövetés tekintetében a dokumentált időszakon belül a túlélés időt, valamint exitáltaknál a halál idejét rögzítettük.

A daganat-kialakulás kockázatára vonatkozó vizsgálatokhoz kontroll csoportként az összehasonlítható daganatos betegcsoporthoz képest kor- és nem szerinti összetételét tekintve statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutató, nem daganatos személyeket alkalmaztunk (182 személy a kolorektális daganatos betegek kontrolljaként, illetve 189 személy a fej-nyaki daganatos betegcsoporthoz). Ezek a résztvevők egyrészt egészséges önként vállalkozók, másrészt a kórház más osztályain fekvő, nem daganatos betegek közül kerültek ki.

### **Genotipizálás:**

A DNS izolálás paraffinos blokkokból, deparaffinálás után, fenol-kloroformos módszerrel történt. A genotipizálásokat polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló módszerekkel végeztük. A p53 génnél allélspecifikus amplifikáció történt, két csőben párhuzamosan, ahol a 3' primer mindkét csőben ugyanaz volt, más-más 5' primerrel. Amennyiben a primer nem teljesen komplementer a templáttal, nem történik amplifikáció.

3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA és

5' primerek, Arg variáns: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG

Pro variáns: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCC

A GSTM 1 és GSTT1 gének esetében PCR reakciót végeztünk, amikor is csak abban az esetben kaptunk terméket, ha a DNS templát jelen volt, vagyis a vizsgált személy a + genotípusba tartozott.

**GSTM1 gén**: primerek: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3',  
3'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-5'.

**GSTT1 gén**: primerek: 5'-TT CC T TAC TGG TCC TCA CAT CTC-3',  
3'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-5'.

Az XRCC1 gén variánsait restrikciós fragment hosszúság-polimorfizmus (RFLP) módszerével vizsgáltuk.

**XRCC1 194-es kodon**: primerek: 5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A -3',  
3'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T -5'.

A reakcióban 485 bp hosszú termék képződik, amit enzimatikus emésztésnek vetettünk alá *PvuII* restrikciós endonukleázzal. *PvuII* hasítási helyet csak a Trp variáns tartalmaz, az emésztés során egy 396 bp és egy 89 bp hosszúságú fragment keletkezik.

**XRCC1 399-es kodon**: primerek:      5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA -3',  
   3'- TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA -5'.

615 bp hosszúságú termék képződik, amit *MspI* restriktációs endonukleázzal emésztettünk. Az *MspI* felismerési hely az Arg variánshoz kötött. Az inkubáció után 374 és 221 bp hosszúságú fragment képződik, míg a Gln allél *MspI* hasítási helyet nem tartalmaz.

### **Statisztikai módszerek:**

Esélyhányadost (OR) és 95% megbízhatósági tartományt (CI) az Epi Info for Windows 3.5.1 (CDC, Atlanta) program segítségével számoltunk. A prognosztikus markerek vizsgálatához a Kaplan-Meier féle túlélési görbéket hasonlítottunk össze, tumor stádiumok szerint csoportosítva a populációt, a génstátusz tekintetében hasonlítottuk össze a túlélési görbéket. A csoportok közötti túlélési különbségek vizsgálatát a log-rank és a Wilcoxon tesztekkel végeztük. A görbék rajzolásához és a statisztikai paraméterek számításához ugyancsak az Epi Info for Windows programot használtuk.

## **EREDMÉNYEK:**

### **A p53, GSTM1 és GSTT1 polimorfizmusok összefüggése kolorektális daganatok kialakulásának kockázatával:**

Eset-kontroll vizsgálatunkban 182 kolorektális daganatos beteget genotipizáltunk a fenti génekre nézve, és az allélgyakoriságokat az ugyanekkora, nem daganatos betegekből álló kontroll csoport allélgyakoriságaival vetettük össze (I. táblázat).

A 0 genotípus statisztikailag szignifikánsan gyakoribb volt a kolorektális daganatos betegeknél (OR: 2,00; 95% CI: 1,29-3,10), vagyis eredményeink szerint a GSTM1 0 genotípus valamelyest fokozza a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatát.

A GSTT1 allélpolimorfizmusokat vizsgálva a különbség statisztikailag nem szignifikáns (OR: 1,57; 95% CI: 0,97-2,53), de megközelíti azt.

A p53 gén esetében az Arg/Arg homozigóta allél előfordulási gyakoriságát hasonlítottuk össze az Arg/Pro heterozigóta és Pro/Pro homozigóta variánsokkal. Heterozigóták esetében statisztikailag szignifikáns különbséget tapasztaltunk a beteg és a kontroll csoport között (34,1% versus 23,1%, OR: 1,80; 95% CI: 1,10-2,94).

	<b>Esetek (n=182)</b>	<b>Kontroll (n=182)</b>	<b>OR, (95% CI)</b>
<b>GSTM1 +</b>	70 (38,5 %)	101 (55,5%)	<b><u>2,00 (1,29-3,10)</u></b>
<b>GSTM1 0</b>	112 (61,5 %)	81 (44,5%)	
<b>GSTT1 +</b>	119 (65,4%)	136 (74,7%)	1,57 (0,97-2,53)
<b>GSTT1 0</b>	63 (34,6%)	46 (25,3%)	
<b>p53 Arg/Arg</b>	110 (60,4%)	134 (73,6%)	
<b>p53 Arg/Pro</b>	62 (34,1%)	42 (23,1%)	<b><u>1,80 (1,10-2,94)</u></b>
<b>p53 Pro/Pro</b>	10 (5,5%)	6 (3,3%)	2,03 (0,64-7,00)
<b>Pro-hordozók (Arg/Pro + Pro/Pro)</b>	72 (39,6)	48 (26,4)	<b><u>1,83 (1,14-2,92)</u></b>

**I. táblázat:** p53, GSTM1 és GSTT1 genotípusok előfordulása az eset- és a kontroll-csoportnál

A Pro homo- és heterozigóták együttes elemzése azt mutatja, hogy a Pro allél jelenléte statisztikailag szignifikánsan emeli a vastag- és végbéldaganatok kockázatát (OR: 1,83 95% CI: 1,14-2,92).

### **A p53, GSTM1 és GSTT1 polimorfizmusok összefüggése a kolorektális daganatok klinikai lefolyásával:**

Vizsgálatunknak az előző ponttól független kérdése volt, hogy a tanulmányozott gének allélpolimorfizmusai bírnak-e prognosztikus értékkel a daganatos betegek szempontjából.

Az utánkövetést 45 hónapig tudtuk folytatni. A betegek túlélése a log-rank teszt alapján statisztikailag szignifikáns összefüggést mutatott a betegség stádiumával (log-rank: 89,59; sz.f.: 3; p: 0,00015)

A vizsgálatban résztvevő betegeket a p53 polimorfizmus alapján két csoportra osztottuk, Arg/Arg homozigótákra, és a Pro allélt hordozókra, és e két csoport túlélési görbéit hasonlítottuk össze. Az Arg/Arg homozigóták túlélési esélyei statisztikailag szignifikánsan jobbak, mint a Pro allélt hordozó résztvevőké (log-rank: 12,98; sz.f.: 1; p: 0,0003). Az összehasonlítást elvégeztük a másik két polimorfizmus vonatkozásában is (GSTM1 és GSTT1). Mindkét metabolizáló enzim allélpolimorfizmusa befolyásolta a



kolorektális daganatok prognózisát, a + genotípusba tartozók túlélési esélyei jobbak voltak (GSTM1: log-rank: 8,03; sz.f.: 1; p: 0,0046, GSTT1: log-rank: 6,29; sz.f.: 1; p: 0,0122).

A következőkben azt tisztáztuk, hogy az egyes allépolimorfizmusok prognózist/túlélést befolyásoló hatása egyformán érvényesül-e a különböző stádiumú daganattal diagnosztizált betegekben, vagy pedig a prognosztikus érték az egyes stádiumokban eltérő lehet. Ehhez az elemzéshez betegeinket Dukes stádiumok szerint csoportosítva vizsgáltuk meg, hogy tapasztalható-e összefüggés a génstátusz és a túlélési idő között.

Az Arg/Arg homozigóták prognózisa az A, C, D stádiumban valamivel jobb, mint a hetero- vagy homozigóta Pro genotípussal bíróké, de igazán jelentős, és egyúttal statisztikailag is szignifikáns különbség csak a Dukes' B stádiumban van. A statisztikai analízis értékeit az II. táblázatba foglaltuk.

Dukes stádium	log-rank	sz.f.	p
A	1,77	1	0,1829
B	7,63	1	<b><u>0,0057</u></b>
C	3,03	1	0,0819
D	2,47	1	0,1162

**II. táblázat:** Összefüggés a betegek túlélése és a p53 genotípusok között (log-rank teszt)

Dukes stádium	log-rank	sz.f.	p
A	1,31	1	0,2523
B	5,83	1	<b><u>0,0157</u></b>
C	2,81	1	0,094
D	2,39	1	0,1225

**III. táblázat:** Összefüggés a betegek túlélése és a GSTM1 genotípusok között (log-rank teszt)

Dukes stádium	log-rank	sz.f.	p
A	0,19	1	0,6642
B	6,66	1	<b><u>0,0099</u></b>
C	1,23	1	0,2674
D	0,25	1	0,6195

**IV. táblázat:** Összefüggés a betegek túlélése és a GSTT1 genotípusok között (log-rank teszt)

A statisztikai értékelés eredményeit a GSTM1 polimorfizmusra vonatkozóan a III, a GSTT1 polimorfizmusra vonatkozóan pedig a IV.táblázat mutatja.

Amint a táblázatokból is látható, mind a GSTM1, mind a GSTT1 polimorfizmus esetében is csak a Dukes' B stádiumban volt statisztikailag szignifikáns kapcsolat a genotípus és a betegek túlélése között. Kisebb mértékű, statisztikailag nem szignifikáns hatás tapasztalható volt a többi Dukes' stádiumban is, az A és D stádiumokban gyengébben, míg a C stádiumban valamivel erősebben.

#### **Az XRCC1 allélpolimorfizmusok összefüggése a fej- nyaki daganatok kialakulásának kockázatával:**

Az allélpolimorfizmusoknak a fej-nyaki daganatok rizikójára gyakorolt hatásának elemzése hasonlóképpen történt, mint a kolorektális daganatok esetében. Annak megítélésére, hogy a vizsgált polimorfizmusok befolyásolják-e a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatát, 189 tumoros beteg allélmegoszlásait vetettük össze ugyanannyi daganatmentes kontroll személy allélmegoszlásaival. Az eredményeket a V. táblázat mutatja.

Az XRCC1 194 polimorfizmusnál a Trp allél tehát mind homo- mind heterozigóta formában ritkábban volt jelen a daganatos csoportban, de ez nem érte el a statisztikai szignifikancia-szintjét (OR: 0,54; 95% CI: 0,71-1,01).

Az XRCC1 399 polimorfizmus esetében a Gln allél statisztikailag szignifikánsan (OR: 1,70; 95% CI: 1,11-2,61) gyakoribb volt a daganatos betegeknél, mint a kontrolloknál, vagyis jelenléte a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatát fokozza.

	<b>Esetek (108)</b>	<b>Kontroll (102)</b>	<b>OR, (95% CI)</b>
<i>Arg194Arg</i>	<b>169 (89,4%)</b>	<b>155 (82,0%)</b>	
<i>Arg194Trp</i>	<b>18 (9,5%)</b>	<b>30 (15,9%)</b>	<b>0,55 (0,28-1,07)</b>
<i>Trp194Trp</i>	<b>2 (1,1%)</b>	<b>4 (2,1%)</b>	<b>0,46 (0,04-3,26)</b>
<i>Arg194Trp+</i> <i>Trp194Trp</i>	<b>20 (10,6%)</b>	<b>34 (18,0%)</b>	<b>0,54 (0,71-1,01)</b>
<i>Arg399Arg</i>	<b>79 (41,8%)</b>	<b>104 (55,0%)</b>	
<i>Arg399Gln</i>	<b>89 (47,1%)</b>	<b>71 (37,6%)</b>	<b><u>1,65 (1,05-2,59)</u></b>
<i>Gln399Gln</i>	<b>21 (11,1%)</b>	<b>14 (7,4%)</b>	<b>1,97 (0,89-4,40)</b>
<i>Arg399Gln+</i> <i>Gln399Gln</i>	<b>110 (58,2%)</b>	<b>85 (44,9%)</b>	<b><u>1,70 (1,11-2,61)</u></b>

**V. táblázat:** XRCC1 Arg194Trp és Arg399Gln genotípusok előfordulása az eset- és a kontroll-csoportnál.

#### **Az XRCC1 polimorfizmusok összefüggése a fej- nyaki daganatok prognózisával:**

A túlélési görbék és a statisztikai értékelés is megerősíti a jól ismert összefüggést a betegség stádiumának növekedése és a túlélés csökkenése között. (log-rank: 103,76; sz.f.: 4; p:0,00032).

A két vizsgált XRCC1 polimorfizmus hatását külön-külön vizsgálva azt kaptuk, hogy az Arg194Trp polimorfizmus statisztikailag szignifikánsan befolyásolja a betegek túlélését, az Arg/Arg homozigóták prognózisa rosszabb, mint a Trp alléllal rendelkező betegeké (log-rank: 6,37; sz.f.: 1; p:0,0116). Az Arg399Gln polimorfizmus esetében az Arg/Arg homozigóták túlélési esélyei voltak jobbak de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak (log-rank: 3,52; sz.f.: 1; p:0,0606).

A továbbiakban az egyes allélpolimorfizmusok hatását stádiumonként elemeztük. A statisztikai elemzés eredményei a VI. és a VII. táblázatokban láthatók. Mindkét polimorfizmusnál statisztikailag szignifikáns hatást találtunk az SIII alcsoportban, míg a többi stádiumban a genotípusoknak nem volt szignifikáns prognosztikus értéke.

Stádium	log-rank	sz.f.	p
I	0,07	1	0,7943
II	0,99	1	0,3211
III	3,92	1	0,0477
IVA	1,02	1	0,3117
IVB	1,85	1	0,1741

**VI. táblázat.** Összefüggés a betegek túlélése és az XRCC1 Arg194Trp genotípusok között (log-rank teszt)

Stádium	log-rank	sz.f.	p
I	0,04	1	0,8492
II	1,42	1	0,2341
III	4,42	1	0,0355
IVA	2,05	1	0,152
IVB	0,24	1	0,626

**VII. táblázat.** Összefüggés a betegek túlélése és az XRCC1 Arg399Gln genotípusok között (log-rank teszt)

## MEGBESZÉLÉS:

Vizsgálatunk az alacsony penetranciájú genetikai tényezők csoportjából célozta meg néhány allélpolimorfizmus szerepének tisztázását. A kolorektális daganatok kialakulásának kockázatát feltehetően befolyásoló tényezők közül a p53 tumor szuppresszor gén 72-es kodon Arg/Pro polimorfizmusát vizsgáltuk, illetve két II-es fázisú metabolizáló enzim (a GSTM1 és a GSTT1) allélpolimorfizmusainak hatását elemeztük. Eset-kontroll vizsgálatunkban kolorektális daganatos betegek allélmegoszlásait vetettük össze nem daganatos kontroll személyek allélgyakoriságaival. Eredményeink szerint a magyar népességben a p53 Pro allél jelenléte statisztikailag szignifikánsan fokozta a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatát (OR: 1,83; 95% CI: 1,14-2,92). Saját

eredményeink tehát azokat a vizsgálatokat támasztják alá, amelyek összefüggést találtak a p53 72-es kodon polimorfizmusa és a kolorektális daganatok kockázata között. Eredményeink összhangban vannak a korábban már említett kísérleti adatokkal, miszerint a Pro variánsú p53 fehérje apoptózist indukáló hatása valamivel gyengébb. Ennek következtében kissé megnőhet a valószínűsége annak, hogy károsodott DNS-állományú sejtek „megmeneküljenek” az apoptózisból, és esetleg daganat-kialakulás alapját képezhessék.

A két glutation-S-transzferáz polimorfizmusnál a 0 genotípus kockázatemelő hatását feltételeztük, hiszen ez a detoxifikáló kapacitás csökkenésével jár. A GSTM1 0 genotípus esetében statisztikailag szignifikáns rizikóemelő hatást találtunk (OR: 2,00; 95% CI: 1,29-3,10), míg a GSTT1 0 genotípusnál a hatás nem volt szignifikáns (OR: 1,57 95% CI: 0,97-2,53), bár a 0 genotípus itt is gyakoribb volt a daganatos betegek között. A GSTM1 polimorfizmusra vonatkozó eredmények teljes mértékben megerősítik a korábbi hasonló, más magyarországi régióban végzett vizsgálat következtetéseit.

A fentiekkel elvi alapon megegyező eset-kontroll vizsgálatot végeztünk fej-nyaki daganatoknál az XRCC1 DNS-reparációs gén két allélpolimorfizmusának tanulmányozására. A rendelkezésre álló irodalmi adatok e polimorfizmusok tekintetében sem voltak egyértelműek, tehát szükségesnek tartottuk a magyar népességből származó mintán saját vizsgálatot végezni. Statisztikailag szignifikáns (OR: 1,70; 95% CI: 1,11-2,61) hatást az Arg399Gln polimorfizmusnál találtunk, a „high-risk” allél a Gln allél volt. Az Arg194Trp polimorfizmusnál a Trp allél ritkábban fordult elő daganatos betegek között, mint a kontroll csoportban, de a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (OR: 0,54; 95% CI: 0,71-1,01).

Az eddigi eredmények demonstrálják, hogy a daganatmegelőzésben figyelembe lehet, sőt figyelembe kell venni a genetikai tényezőket is. Vizsgálatunkban 1,7-1,8-2-szeres kockázatkülönbségeket találtunk a tanulmányozott allélpolimorfizmusoknak betudhatóan. A XXI. században a primér prevenciónak is alkalmaznia kell a modern molekuláris genetika módszereit, és ezek figyelembe vételével kell új stratégiákat kidolgoznia. Ebbe az irányba mutató lépést tettünk meg vizsgálatunkkal.

Míg az alacsony penetranciájú genetikai tényezőket – vagy más megnevezéssel egyéni érzékenységi tényezőket – különösen az utóbbi évtizedben nagyon sokan vizsgálták a daganat-kialakulás kockázata szempontjából, prognosztikus faktorként jóval kevesebb adat áll rendelkezésre. A GSTM1 és GSTT1 polimorfizmusok azért kínálnak jó lehetőséget ezekre a vizsgálatokra, mert a 0 és + genotípus között óriási különbség van: az egyik esetben van működőképes enzim, a másikban pedig nincs.

Saját vizsgálatunkban az allélpolimorfizmusok prognosztikus értékét az egyes stádiumokban külön-külön is vizsgáltuk, és az eredmények azt mutatják, hogy valóban ez a hatás stádiumspecifikus. Kórházunk beteganyaga alapján a prognosztikus érték Dukes' B stádiumban statisztikailag szignifikáns, mindkét metabolizáló enzim esetében. Ez gyakorlati szempontból azért figyelemre méltó, mert ezen betegeknél igen jelentős különbség lehet az egyes csoportok túlélése között: saját vizsgálatunkban a Dukes' B stádiumú GSTT1 0 genotípusú betegeknél a medián túlélés 21 hónap volt (a GSTM1 esetén mindössze 20 hónap), míg a + genotípusú csoportban még 45 hónap múlva is a betegek több, mint fele életben volt. A korai illetve a késői stádiumban nem találtunk jelentős különbségeket, a korai stádiumban a túlélések alapvetően jók (többé-kevésbé függetlenül a vizsgált genotípusoktól), míg az előrehaladott fázisban levő betegeknél egyik genotípus sem jelentett kivételt a meglehetősen rossz prognózis és rövid túlélés alól. Saját vizsgálatunkban mindkét metabolizáló enzimmél a + genotípus volt kedvező prognosztikus jel.

Eredményeink hasonlóak voltak a p53 allélpolimorfizmusnál is. Itt is a Dukes' B stádiumnál számított igazán a p53 genotípus prognosztikus jelentősége. Eredményeink szerint a Pro allélt hordozók prognózisa volt rosszabb. Ez ellentétben áll várakozásainkkal, mivel a Pro allél rendelkezik gyengébb apoptotikus hatással, vagyis az Arg/Arg homozigóta daganatsejtek feltehetően jobban reagálnak a DNS-károsításon alapuló citosztatikus terápiára. További vizsgálatokat igényel az eredmények molekuláris szintű magyarázata, illetve a gyakorlat szempontjából pedig érdekes lenne megvizsgálni, hogy a különböző kezelési sémákban milyen eltérések vannak a p53 72-es kodon polimorfizmusának prognosztikus értékét illetően.

A fej-nyaki daganatoknál a DNS reparációs gének közé tartozó XRCC1 gént vizsgáltunk. Elméletileg itt is a gyengébb repair kapacitás lenne a kedvező prognosztikus jel, hiszen ezek a sejtek valószínűleg érzékenyebbek a citosztatikus terápiára. Az

Arg399Gln polimorfizmus esetén mi is a Gln allél kedvezőbb prognosztikus hatását észleltük az irodalommal egyezően, de nem az előrehaladott, hanem az S III-as stádiumban.

Prognózissal illetve túléléssel kapcsolatos vizsgálataink talán legfontosabb megállapítása, hogy az elemzett allélpolimorfizmusok prognosztikus értéke mind a kolorektális, mind a fej-nyaki daganatok esetén nem az előrehaladott stádiumú betegeknél, hanem a korai és az előrehaladott stádiumok közötti „átmeneti” csoportokban a legmagasabb. Az irodalomban megjelent, amúgy is kevés hasonló jellegű vizsgálatban feltehetően azért van viszonylag kevés pozitív eredmény, mert vagy stádium-csoportosítás nélkül, a daganatos betegek összességére, vagy – és ez a gyakoribb – az előrehaladott stádiumú betegekre koncentrálnak végezték azokat. Adataink szerint viszont elsősorban a Dukes' B (kolorektális) illetve az SIII (fej-nyaki) stádiumú daganatok esetén lenne igazán fontos ezen allélpolimorfizmusok alkalmazása független prognosztikus markerként. A fenti típusú vizsgálatok a jövőben talán elvezetnek bennünket a pontosabb egyéni rizikóbecsléshez és a valóban individualizált terápiához.

## **SAJÁT EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA:**

- A GSTM1 0 genotípusú személyek vastag- és végbélrák kockázata statisztikailag szignifikánsan magasabb, mint a GSTM1 + genotípusúaké (OR: 2,00; 95% CI: 1,29-3,10), a GSTT1 esetén nem találtunk szignifikáns különbséget.
- A p53 Pro allélt hordozó személyek kolorektális daganatos kockázata szignifikánsan magasabb volt, mint az Arg/Arg homozigótáké (OR: 1,83 95% CI: 1,14-2,92).
- A p53 Pro allél nemcsak a daganatkialakulás kockázatát fokozta, hanem kolorektális daganatos betegeknél a kedvezőtlenebb prognózis markere volt. Az Arg/Arg genotípusú betegek túlélése statisztikailag szignifikánsan hosszabb volt, mint a Pro allélt hordozóké (log-rank: 12,98; sz.f.: 1; p: 0,0003). A GSTM1 és a GSTT1 + genotípusok ugyancsak szignifikánsan kedvező prognosztikus markereknek bizonyultak (túlélési idők összehasonlításában: GSTM1 log-rank: 8,03; sz.f.: 1; p: 0,0046, GSTT1 log-rank: 6,29; sz.f.: 1; p: 0,0122). Mindhárom genotípust vizsgálva a prognosztikus értékek a Dukes B stádiumban voltak a legnagyobbak .

- Fej-nyaki daganatok kockázatát vizsgálva, az XRCC1 194-es kodon polimorfizmusa nem bizonyult szignifikáns kockázati tényezőnek, viszont a 399-es kodon polimorfizmusánál a Gln allél jelenléte statisztikailag szignifikánsan fokozta a daganatkialakulás kockázatát (OR: 1,70; 95% CI: 1,11-2,61).
- A daganat prognózisa rosszabb – tehát az átlagos túlélés rövidebb – volt, ha a betegek az XRCC1 194-es kodon Arg/Arg genotípusba tartoztak (log-rank: 6,37; sz.f.: 1; p:0,0116), míg a 399-es kodonnál az összefüggés nem volt statisztikailag szignifikáns. A stádiumonkénti részletes elemzés azt mutatta, hogy az Arg194Trp (p=0,0477) és az Arg399Gln (p=0,0355) polimorfizmusnál is a III. stádiumú betegeknél volt szignifikáns különbség a túlélésben, a többi stádiumban a prognosztikus érték nem volt statisztikailag szignifikáns.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Dr. Ember István** professzor úrnak, aki lehetővé tette számomra Doktori Iskolájában munkám elvégzését. Köszönöm **Dr. Kiss István** docens úrnak irányító tevékenységét és gyakorlati tanácsait, valamint **Dr. Tibold Antal** tanársegéd úrnak a laboratóriumi munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Köszönettel tartozom **Dr. Tóth Csaba** osztályvezető főorvos úrnak a pathológiai háttér biztosításáért. Hálás vagyok a Markusovszky Kórház vezetésének és munkatársaimnak, hogy munkám során mindenben segítettek.



**Allelic polymorphisms as biomarkers of risk  
and outcome in colorectal and head and neck  
cancer**

**PhD thesis**

**András Csejtei MD**

*Program leader: Prof. Dr. med. habil. István Ember DSc*

*Consultant: Dr. med. habil. István Kiss PhD*

**2010 Pécs**

## **INTRODUCTION:**

Malignancies of the gastrointestinal tract are among the most frequent malignant diseases in Hungary. Cancer of the colorectal region is the second most frequent cause of death from malignant diseases. Traditional gastronomical habits which include fatty and dietary fiber deficient foods and the popularity of meats preserved by smoke explain the high prevalence of these diseases.

Head and neck cancer is a malignant disease of the upper aerodigestive tract (oral, pharyngeal, and laryngeal regions); histologically it is commonly squamous cell carcinoma. In 2006, 70,200 cases were registered in the European Union, which is 3.1% of the total number of cancer cases. The number of fatalities caused by this type of cancer was 25,300 in the same year. All together, cancer of the head and neck region is the third most common cause of cancer death among men in Hungary. Unfortunately the incidence and mortality of head and neck cancer shows an increasing tendency. In 1975, only 462 patients died from head and neck cancer. This means that the mortality of this cancer has increased by 387 % in the last thirty-two years in Hungary.

### **Metabolizing enzymes:**

In our present study we aim to examine the relationship between certain allelic polymorphisms and related cancer risk, and its influence on the survival of the patients. Our area of interest is in two allelic polymorphisms of glutathione-*S*-transferases, the GSTM1 and GSTT1 metabolizing enzymes. Glutathione-*S*-transferases (GSTs) are involved in the metabolism of endogenous and exogenous carcinogenic substances, such as environmental carcinogens, reactive oxygen species and chemotherapeutic agents, by catalyzing reactions between glutathione and electrophilic compounds and is an important means of cellular protection against mutagenic factors. In humans, GST enzymes are divided into five subclasses: alpha ( $\alpha$ ), mu ( $\mu$ ), pi ( $\pi$ ), theta ( $\theta$ ) and zeta ( $\zeta$ ). GSTM1, belonging to the  $\mu$  class is located on chromosome 1, while GSTT1, belonging to the  $\theta$  class, is located on chromosome 22. GSTM1 products catalyze the conjugation of glutathione to epoxide derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons, which are found in tobacco smoke and in smoked meats in high concentration. GSTT1 products are involved in activation and

detoxification reactions and catalyze the conjugation of industrial chemicals with glutathione.

The null genotype of these genes (deletions of both paternal and maternal alleles) causes the lack of GSTM1 and GSTT1 proteins which results in an increased risk of development of certain types of cancers. Polymorphisms in GSTM1 and GSTT1 may modify the risk of colorectal cancer, and may be important in determining an individual's susceptibility to colorectal cancer.

### **P53 tumor suppressor gene:**

Another target of our study was to investigate the influence of p53 on colon cancer. P53 is a tumor-suppressor gene that plays an important role in controlling cell cycle regulation and inhibiting clonal expansion. P53 is one of most frequently mutated genes in malignant diseases. Several polymorphisms have been registered in the p53 gene locus. One of the most important polymorphisms of this area is in codon 72 of exon 4 coding for the Arg (72Arg: CGC), or Pro (72Pro: CCC) variant. The Arg variant has been shown to induce apoptosis with higher efficacy than the Pro variant. Several studies found a relationship between p53 aberration and malignancies, including colon carcinoma.

### **XRCC1 (X-ray repair cross complementing) gene:**

Carcinogenic metabolites of tobacco and alcohol cause direct DNA damage and, in addition, produce oxidative stress which also contributes to the carcinogenic process. Naturally, genetic susceptibility plays an important role in the development of malignant disease. A multiplex mechanism protects against DNA lesions inside cells. Base damage and single-strand breaks (SSBs) of DNA are the most frequent DNA lesions and they are repaired through base excision repair (BER) mechanisms.

X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) protein plays an important role in the BER pathway. The observation that XRCC1 deficiency in mice is lethal in the embryonic stage supports the theory that the function of XRCC1 is a key factor in DNA repair. Mutations in the XRCC1 gene are known to contribute to the development of human

tumours. Based on data from the literature, two SNPs might be associated with the development of malignant diseases: Arg194Trp in exon 6 and Arg399Gln in exon 10.

In our study, we tested the effect of allelic polymorphisms GSTM1, GSTT1 and p53 in colorectal cancer, and XRCC1 polymorphisms in head and neck cancer in the Hungarian population.

These polymorphisms may be able to modify the risk of cancer development in humans and might also have an effect on the clinical outcome of malignant diseases.

## **OBJECTIVES:**

- To determine the distribution of GSTM1 and GSTT1 0/+ alleles among colorectal cancer patients and healthy control individuals. (Effect of GSTM1 and T1 polymorphisms on the risk of development of colorectal cancer.)
- To determine the distribution of Arg/Pro alleles in codon 72 of p53 suppressor gene among colorectal cancer patients and healthy control individuals. (Effect of Arg/Pro in codon 72 of p53 gene on the risk of development of colorectal cancer.)
- Is there any difference among the overall survivals of colorectal patients with different alleles of GSTM1, GSTT1 and p53 genes? (Do the examined polymorphisms have any influence on the prognosis of colorectal tumors? ) Is there any difference in the effect of these polymorphisms on the survival according to the stage of disease?
- To determine the distribution of different alleles of codons 194 and 399 in XRCC1 gene among head and neck cancer patients and healthy control individuals. (Effect of XRCC1 polymorphisms on the risk of development of head and neck cancer.)
- Is there any difference among the overall survivals of head and neck cancer patients with different alleles of XRCC1 gene? (Do the above mentioned polymorphisms have any influence on the prognosis of head and neck tumors? ) Is there any difference in the effect of these polymorphisms on the survival according to the stage of disease?

## MATERIAL AND METHODS:

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were used for the first part of the study. Samples were collected in the Markusovszky Hospital (Szombathely, Hungary). All colorectal cancer cases were diagnosed as adenocarcinomas. 182 patients were enrolled in our study (127 males and 55 females; mean age  $63.4 \pm 6.4$  years). For tumor staging, Dukes' classification was used: 50 tumor cases were Dukes' A, 50 were Dukes' B, 50 were Dukes' C, and 32 Dukes' D. All patients were followed up. Survival data were taken from the oncological departments' database.

A 2  $\mu$ l DNA solution separated from paraffin embedded tissue blocks was used for PCR. For amplification the following primers were used:

GSTT1: forward                               5'-TT CC T TAC TGG TCC TCA CAT CTC-3',  
reverse                                       5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3';  
and GSTM1: forward                       5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3',  
reverse                                       5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'.

P53 genotyping (codon 72, Arg/Pro polymorphism) was performed using 3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA and 5' primers for Arg variant ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG and for the Pro variant ATGCCAGAGGCTGCTCCCC. For the PCR reaction, PCR Master Mix (Promega, Woods Hollow, USA) was used, according to the manufacturer's instructions.

The results were compared with those obtained from age-and sex-matched healthy controls.

189 patients participated in the head and neck cancer study. Sample collection, pathological identification and collection of clinical variables were carried out at the Markusowszky County Hospital Szombathely, Hungary. Men were overrepresented in the population: samples originated from 163 men and only 26 women. The mean age $\pm$ SD of patients was  $57.6 \pm 8.1$  years. All patients had a history of smoking and all patients had a histological diagnosis of squamous cell carcinoma. The samples were taken from intraoperatively removed, formalin-fixed and paraffin-embedded blocks of tissue.

For staging of the patients, the American Joint Committee on Cancer (AJCC) criteria were used. According to these criteria, 14 SI, 12 SII, 37 SIII, 32 SIVA and 13 SIVB stage

patients were identified. Patients with head and neck cancer were followed up, with the endpoint being either an interval of 60 months after diagnosis or on the death of the patient.

An age- and sex-matched healthy control group of 102 individuals was used to compare the frequency of polymorphic variants in patients with those of a cancer-free population.

For PCR reaction, 5 µl of DNA solution was used. For genotyping of XRCC1 a PCR - based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used.

Primer sequences for exon 6, Arg194Trp were:

5'- GCC AGG GCC CCT CCT TCA A -3' and

5'- TAC CCT CAG ACC CAC GAG T -3'.

The primers for Arg399Gln on exon 10 were:

5'- TGC TTT CTC TGT GTC CA -3' and

5'- TCC AGC CTT TTC TGA TA -3'.

The amplification was performed in a 25 µl reaction volume, with Platinum PCR Supermix (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions.

The restriction enzyme *PvuII* was used to distinguish the Arg194Trp polymorphism and *MspI* enzyme to distinguish the Arg399Gln polymorphism. The restriction products were analyzed by electrophoresis on a 3% agarose gel containing ethidium bromide.

Additionally, we determined whether a subset of these polymorphisms was related to the overall survival of the patients in the hope that genotypes could be used to predict survival of patients with head and neck cancer. Kaplan-Meier survival analyses were performed after the samples were divided into groups according to gene status. A probability of  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

Epi Info for Windows program was used for all statistical and graphical purposes.

## **NEW RESULTS ACCORDING TO THE SCIENTIFIC OBJECTIVES:**

- Individuals with GSTM1 0 genotype had a significantly higher risk of development of colorectal cancer (OR: 2.00, 95% CI: 1.29-3.10) In case of GSTT1 the difference has not proved to be statistically significant.

- Individuals bearing a Pro allele of p53 gene had a significantly higher risk of development of colorectal cancer than the Arg/Arg homozygotes (OR: 1.83, 95% CI: 1.14-2.92).
- -The Pro allele of p53 gene proved to be an unfavourable prognostical marker in colorectal cancer patients. Patients bearing the Arg/Arg allele have a significantly longer survival than those with Pro allele (log-rank:12.98, d.f.: 1, p: 0.0003 ). GSTM1+ and GSTT1+ alleles proved to be also favourable prognostic markers, (comparing survivals: GSTM1 log-rank: 8.03, d.f.: 1, p: 0.0046, GSTT1 log-rank: 6.29, d.f.:1, p: 0.0122 ). In case of all three genotypes, their prognostic values seemed to be most significant in Dukes B stage.
- In case of head and neck cancer, the polymorphism of codon 194 of XRCC1 gene was not proved to be a significant risk factor, but the presence of Gln allele of codon 399 resulted in a higher risk for development of cancer (OR: 1.70, 95% CI: 1.11-2.61).
- The prognosis of the head and neck cancer was more unfavourable – the overall survival was shorter – by patients bearing the Arg/Arg allele on codon 194 of XRCC1 gene (log-rank: 6.37, d.f.: 1, p:0.0116). In case of codon 399, there was no statistically significant association. Both Arg194Trp (p:0.0477) and Arg399Gln (p: 0.0355) polymorphisms resulted in statistically significant overall survival differences at stage III. patients. In other stages there was no significant difference.

## **A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK - THE THESIS IS BASED IN THE FOLLOWING PUBLICATIONS:**

- A. Csejtej**, A. Tibold, Zs. Varga, K. Koltai, Á. Ember, Zs. Orsós, G. Fehér, Ö. P. Horvath, I. Ember, I. Kiss: GSTM, GSTT and p53 polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. *Anticancer Research* 28: 1917-1922, 2008. imp. f.: 1,479
- Csejtej A.**, Tibold A., Ember I., Kiss I.: Allélpolimorfizmusok vizsgálata colorectalis és fejnyak táji daganatos betegekben. *Orvosi Hetilap*, 150(33): 1545-1549, 2009.
- A. Csejtej**, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Varga, I. Szanyi, Gy. Göbel, I. Prantner, D. Steffler, G. Fehér, A. De Blasio, I. Ember, I. Kiss: Association between XRCC 1 polymorphisms and head and neck cancer in Hungarian population. *Anticancer Research*. (Közlésre elfogadva).

## **A TÉZISEKTŐL FÜGGETLEN PUBLIKÁCIÓK - OTHER PUBLICATIONS:**

- Á. Németh, E. Nádasi, Z. Gyöngyi, L. Olasz, Z. Nyárádi, Á. Ember, A. Kvarda, L. Bujdosó, I. Arany, I. Kiss, A. Csejtej, I. Ember: Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. *Anticancer Research* 23:4831-4836 (2003) imp. f.: 1.347
- Faluhelyi Zs., Rodler I., Csejtej A., Tying 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. Csejtej, 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. Csejtej, Zs. Faluhelyi, I. Ember: Early effects of Transplatin on oncogene activation in vivo. *Anticancer Research* 24:3997-4002 (2004). imp. f.: 1,395
- I. Kiss, Á. Németh, B. Bogner, G. Pajkos, Zs. Orsós, J. Sándor, A. Csejtej, 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.: 1,395
- A. Tibold, G. Fehér, A. Csejtej, A. Tettinger, I. Kiss: Selective serotonin reuptake inhibitors may interfere with the antiplatelet effect of clopidogrel. *American J. Cardiol.* 2007. 99(7):1025-1026. imp. f.: 3,015



- I. Kiss, Zs. Orsós, K. Gombos, B. Bogner, A. Csejtej, A. Tibold, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Magda, A. Zólyomi, I. Ember: Association between allelic polymorphism of metabolizing enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, mEH) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. *Anticancer Research* 27:2931-2938, 2007. imp. f.: 1,479
- I. Szanyi, L. Lujber, I. Gerlinger, J. Pytel, M. Bauer, A. Csejtej, E. Szele, K. Gombos, I. Kiss, S. Seredenin, M. Yarkova, I. Ember: In vivo effects of Afobazole (2-Mercaptobenzimidazole Derivate) on the 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene-induced oncogene and suppressor gene expression. *In Vivo* 21: 1059-1064 (2007). imp. f.: 1,273
- Csontos Z., Nádas E., Csejtej A., Illényi L., Kassai M., Lukács L., Kelemen D., Kvarda A., Zólyomi A., Horváth Ö. P., Ember I.: Onco- and tumor suppressor gene expression changes in the peripheral blood leucocytes of patients with colorectal cancer. *Tumori*, 94:79-82, 2008. imp. f.:0,701

## CITÁLHATÓ ABSZTRAKTOK - THE LIST OF ABSTRACTS:

- A. Tibold, I. Kiss, I. Ember, A. Csejtej, Z. 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. Csejtej, G. Nowrasteh, T. Varjas: Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer. VII. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. *Anticancer Res.* Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3480.
- I. Ember, Cs. Varga, L. Pajor, E. Nádas, T. Varjas, G. Nowrasteh, A. Csejtej, L. Bujdosó, I. Rödler, A. Kvarda: Trans-Hexenal, a new naturally occurring carcinogen. VII. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. *Anticancer Res.* Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3479.
- Á. Ember, Á. Németh, Cs. Varga, Zs. Faluhelyi, A. Csejtej, 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. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. *Anticancer Res.* Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3479.
- Zs. Faluhelyi, Á. Ember, R. Schnabel, I. Rödler, Gy. Czakó, E. Pázsit, Á. Németh, J.L. Iványi, Zs. Dombi, A. Kvarda, L. Bujdosó, A. Csejtej, A. Sebestyén, I. Boncz, I. Ember: CMF protocol has an effect on onco/suppressor gene expression - in vivo. VII. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. *Anticancer Res.* Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3483.
- I. Kiss, Zs. Orsós, A. Csejtej, R. Schnabel, Zs. Faluhelyi, B. Bogner, J. Sándor, Á. Németh, I. Ember: Allelic Polymorphisms of metabolizing enzymes modify the risk of

colorectal cancer. VII. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. Anticancer Res. Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3536.

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. Int. Conf. of Anticancer Res., Corfu. Anticancer Res. Vol.24, Number 5D, Sept-Oct. 2004 pp:3663.

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. Kongr., Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Suppl., II. évf. 1. szám pp:34

Csejtej A.: Kolorektális daganatok molekuláris epidemiológiai markerei. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Kongr., Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Suppl., II. évf. 1. szám pp:35

Csontos Zs., Kiss I., Szanyi L.: Csejtej A., Bujdosó L., Illényi L., Kassai M., Lukács L., Ember I., Horváth Ö. P.: Génexpressziós profilváltozás colorectalis daganatokban. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Kongr., Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Suppl., II. évf. 1. szám pp 36

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. Kongr., Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Suppl., II. évf. 1. szám pp:39

Tibold A., Koltai K., Csejtej A., Faluhelyi Zs., Kiss.I., Ember I.: Összefüggés az XRCC1 polimorfizmus és a fej-nyaki daganatok között. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Kongr., Pécs, 2005. április 1-2. Magyar Epidemiológia Suppl., II. évf. 1. szám pp:88

I. Kiss, Zs. Orsós, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, Zs. Varga, E. Pázsit, I. Ember: Single nucleotide polymorphism in DNA repair genes affect the risk of colorectal cancer / 357. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. Int. Journal of Molecular Medicine, Supplement 2006 vol. 18: 357. imp. f.: 2,09

Zs. Orsós, J. Béres, A. Csejtej, Zs. Faluhelyi, I. Ember, I. Kiss: Allelic polymorphism of XRCC1 DNAREPAIR gene in the hungaryan roma (gipsy) population / 358. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. Int. Journal of Molecular Medicine, Supplement 2006 vol. 18: 358.

A. Csejtej, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Faluhelyi, Zs. Orsós, I. Kiss, I. Ember: Allelic polymorphisms as modifilers of colorectal cancer risk / 361. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. Int. Journal of Molecular Medicine, Supplement 2006 vol. 18: 361.

A. Csejtej, A. Tibold, I. Kiss, I. Ember: Összefüggés az XRCC1 polimorfizmus és a fej-nyaki daganatok között. III<sup>rd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and

predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs . Magyar Epidemiológia Supplementum, III. évfolyam 2006, pp: S32

- Zs. Csontos, A. Csejtej, A. Kvarda, L. Illényi, Ö.P. Horváth, I. Ember: A p53, Ha-ras és c-myc gének expressziójának vizsgálata colorectalis daganatos betegek perifériás fehérvérsejtjeiben. III<sup>rd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs . Magyar Epidemiológia Suppl., III. évfolyam 2006, pp: S35
- A. Tibold, A. Csejtej, I. Kiss, I. Ember: Összefüggés az XRCC1 polimorfizmus és a pajzsmirigy daganatok között. III<sup>rd</sup> Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs. Magyar Epidemiológia Suppl., III. évfolyam 2006, pp: S81
- Kiss I., Pajkos G., Orsós Zs., Gombos K., Tibold A., Faluhelyi Zs., Varga Zs., Csejtej A., Ember I.: Int. Conf. Recent Advances in Clinical Oncology. 2007. 19-22 February, Al Ain – United Arab Emirates. Emirates Medical Journal, Vol. 25. Number 1. (suppl.), 2007.
- Csejtej A., Tibold A., Tettinger A., Ember I.: Allélpolimorfizmusok, mint a kolorektális tumor rizikó módosító tényezői. A PTE Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése. Pécs, 2007. június 9. Magyar Epidemiológia, Suppl., IV. évf. 2007, pp: 35
- Csejtej A., Tibold A., Kiss I., Ember I.: GSTM, GSTT és p53 gének polimorfizmusai, mint a kolorektális daganatok kimenetelének befolyásoló tényezői. NETT XVI. Nagygyűlése, Pécs, 2008. április 17-19. Magyar Epidemiológia Supplementum, V. évf., 2008, pp:30
- I. Kiss, Zs. Orsós, A. Tibold, Zs. Varga, J. Cseh, A. Csejtej, I. Ember: Low penetrance genetic susceptibility factors in human carcinogenesis. 8th International Conference of Anticancer Research. Greece, Kos 17-22 October, 2008. Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3351: A345
- A. Csejtej, A. Tibold, K. Koltai, Zs. Varga, I. Szanyi, Gy. Göbel, I. Prantner, D. Steffler, I. Ember, I. Kiss: Association between XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer in Hungarian population. 8th International Conference of Anticancer Research. Greece, Kos 17-22 October, 2008. Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3517: A676
- A. Tibold, A. Csejtej, Zs. Varga, K. Koltai, Á. Ember, Zs. Orós, I. Ember, I. Kiss: Allelic Polymorphisms as modifiers of clinical outcome in colorectal cancer. 8th Int. Conf. of Anticancer Research. Greece, Kos 17-22 October, 2008. Anticancer Research 28:5C, September-October 2008, 3518: A677
- Csejtej A., Tibold A., Kiss I., Ember I.: Allélpolimorfizmusok szerepe a fej-nyaktáji és kolorektális daganatok predikciójában. IV<sup>th</sup> Congress of the Society of the Hungarian Epidemiology. Pécs, 28-29 November, 2008. Magyar Epidemiológia Supplementum V. évf., pp: S.136, 2008.