

**Mikro-RNS expresszió vizsgálata cervicalis
dysplasiákban és humán cervixdaganatokban**

dr. Gőcze Katalin

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (D94)

Vezető: Dr. Kovács L. Gábor

Daganatok molekuláris epidemiológiája (B-149/1993)

Témavezető:

Dr. Ember István†

Dr. Kiss István



2015

Bevezetés

A szervezett szűrővizsgálatok ellenére a méhnyak rosszindulatú daganata még mindig globális népegészségügyi probléma, ami elsősorban a 30 és 55 év közötti nőket érinti. A méhnyakrák Magyarországon a rosszindulatú nőgyógyászati daganatok kb. 30%-át teszi ki, évente átlagosan 1490 új megbetegedéssel (2008-2012) és 407, a daganat következtében kialakult halálesettel (2008-2012) számolhatunk. Európai összehasonlításban hazánk a legrosszabb mutatókkal rendelkező országok közé tartozik. A magas onkogén kockázatú HPV etiológiai szerepe vitathatatlan, de érdemes kihangsúlyozni, hogy a daganatkialakulás aránya mindössze 3-4%. A daganatmegelőző állapotok invazív malignus folyamatokba történő átmenetének kockázatát ugyan még nem áll módunkban előrevetíteni, de ebben nagy valószínűséggel a többszörös HPV infekciók és a HPV variabilitás is döntő szerepet játszik. A fiatalabb nőkben gyakoribb multiplex infekció esetén a cervikális léziók indukcióját és progresszióját illetően szinergista hatást feltételeznek, mivel több HPV típus jelenléte korrelál a dysplasia súlyosságával. A többszörös fertőzések gyakoriságát az egyszeri keresztmetszeti, a vírussal történt fertőzöttség kimutatását célzó vizsgálatok alábecsülik.

Szövettanilag a méhnyakdaganatok körülbelül 75-80%-a laphámcarcinoma (SCC), 20-25%-a adenocarcinoma (ACC). A laphámdaganatok kialakulását jellegzetes, a dysplasia különböző fokának megfelelő morfológiai sajátosságú squamosus intraepithelialis léziók kialakulása előzi meg. Az SCC esetek 99%-ban igazolt a HPV pozitivitás, melyből több mint 70% a két leggyakoribb típus (HPV 16 és 18) aránya. A cervix adenocarcinomák száma az utóbbi 2-3 évtizedben folyamatosan emelkedik, mégpedig elsősorban a fiatal, 35 év alatti korosztályban. Prognózisa rosszabb, rövidebb az átlagos túlélés és hajlamosabb a későbbi kiújulásra. A méhnyakrák klinikai stádiumbeosztása nemzetközileg meghatározott, elfogadott irányelvek alapján történik (FIGO).

A molekuláris biológiai alapú daganatkutatás jelentős előrelépéseket tesz az egyénre szabott kockázatbecslés, szűrés, terápia és a biomarker fejlesztés területén. A mikroRNS-ek molekuláris technológiai alkalmazhatósága egyre szélesebb spektrumot ölel fel a tumor predikció, diagnosztika, utánkövetés és prevenció vonatkozásaiban. A szöveti mikroRNS reguláció változásainak pontos feltérképezése és nyomon követése magában rejti biomarkerként történő alkalmazásuk lehetőségét cervix daganatok vonatkozásában.

Célkitűzések

1. Milyen típusú magas onkogén potenciálú HPV típusok, milyen gyakorisággal fordulnak elő vizsgálati anyagainkban a két leggyakoribb szövettani típus esetében. Többszörös HPV fertőzések gyakorisága és a genotípusok megoszlása

2. Célzott miRNS expressziós profil vizsgálata eltérő HPV státuszú és hisztológiájú cervix daganatokban
 - a. tapasztalható-e eltérés a vizsgált miRNS-ek expressziójában laphám ill. mirigyhám sejtes cervixdaganatok esetén
 - b. milyen különbségek mutathatók ki HPV negatív ill. HR HPV pozitív minták esetén
3. miRNS expressziós mintázat célzott vizsgálata különböző klinikai stádiumú cervixdaganatban különös tekintettel az egyszeres és többszörös HPV pozitivitás függvényében mutatott különbségekre
 - a. tapasztalható-e különbség az eltérő klinikai stádiumú cervixdaganatok miRNS expresszióját illetően
 - b. ezek összefüggésbe hozhatók-e egyszeres és többszörös HPV jelenlétével
4. miRNS expressziós mintázat célzott vizsgálata HR HPV fertőzött, kóros, preneoplasztikus és neoplasztikus hámelváltozásokban
 - a. milyen eltérések vannak a HR HPV fertőzés kapcsán kialakult daganatmegelőző állapotai és korai stádiumú (FIGO I) cervixdaganat között a vizsgált miRNS-ek expressziója szintjén
 - b. ezeket az expressziós különbségeket befolyásolják-e a HPV fertőzés egyes jellemzői (egyszeres és többszörös HPV pozitivitás, HPV16 pozitivitás)
 - c. ezen eltérések összefüggésbe hozhatók-e a betegek demográfiai, szocioökonómiai és életmódjukra jellemző tényezőivel
5. Lehetséges miRNS biomarkerek azonosítása magas onkogén kockázatú HPV fertőzés következtében kialakult cervicalis dysplasia fokozatainak elkülönítésére és a későbbiekben a fertőzés kimenetelének megítélésére

Anyagok és módszerek

Munkánk során a Pécsi Tudományegyetem Patológiai intézetének archívumából 50 db formalin-fixált, paraffinba ágyazott, primer cervixdaganat szövettani blokkja került feldolgozásra (2007-2013). A mintaválasztás során egyenlő arányban, a megadott időszak során diagnosztizált esetek közül random módon került laphámrák és mirigyhámsejtes daganat kiválasztásra. A HPV státuszra vonatkozóan a vizsgálat kezdetekor csak korlátozott információink voltak, egyes esetekben előzetes HR HPV jelenléte vagy hiánya igazolást nyert, ám genotipizálás az anamnézisben nem szerepelt. A metszeteket minden esetben mikroszkópos vizsgálatnak is alávetettük és a HPV státuszra utaló pathomorfológiai jelek keresésével kontrolláltuk a szelekciós folyamatot. A HPV infekcióval összefüggésbe hozható miRNS expressziós eltérések tisztázása érdekében mindkét szövettani típus esetén statisztikailag reprezentatív mintaszámra törekedtünk. FIGO szerinti stádiumbeosztás alapján a mintáink 0-IV. stádiumnak feleltek meg.

A második kísérlet sorozat során a 2009-2014-es időszak alatt a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján kezelt, kizárólag preoperatív neoadjuváns ill. irradiációs kezelésben nem részesült betegek szövettani blokkjait dolgoztuk fel (PTE Patológiai Intézet). Összesen 100 db, igazoltan HR HPV pozitív cervicalis intraepithelialis neoplasia (CIN1-3) és korai stádiumú (FIGO I) laphámkarzinóma került kiválasztásra. A szelekció során feltétel volt a HPV genotípus ismerete, továbbá törekedtünk egyszeresen és többszörösen pozitív mintákat is bevinni vizsgálatainkba. A minták minden esetben a PTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján kezelt, kizárólag preoperatív neoadjuváns ill. irradiációs kezelésben nem részesült betegek szövetmintáiból (konizáció, méheltávolítás) származtak.

A vizsgált miRNS-panel az alábbi, onko- és tumorsuppresszor miRNS-eket foglalta magába: miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-196a, miR-203 és miR-221.

Deparaffinálás és HPV tipizálás

A paraffin kioldását és a rehidrációt xilol hozzáadásával és leszálló alkoholsor különböző koncentrációjú tagjainak (abs., 96%, 60%, 50% etilalkohol) egymás után történő cseréjével értünk el. A HPV genotipizálást a Genoid Kft laboratóriumában (Budapest) végezték, a laboratórium munkatársai által kifejlesztett eljárás alapján, melynek első lépcsője konvencionális PCR rendszerben (Full Spectrum HPV PCR, Genoid, CE) zajlott. Az amplifikációs termékeket ELISA módszerrel, genotípus specifikus próbákkal detektálták validált, szabadalmaztatott eljárás (PCT/HU03/00020, US 2005/0250092 A1) szerint.

Teljes RNS izolálás és reverz transzkripció

A szöveti miRNS meghatározást 40 µg szövetből kiindulva végeztük. A miRNS izolálás High Pure miRNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany) segítségével történt, standard protokoll szerint. Az izolált RNS minőségét abszorpciós fotometriával ellenőriztük és a kinyert RNS mintákat csak abban az esetben alkalmaztuk további qRT-PCR vizsgálatokban, amennyiben az A260/280 nm 1,9 felett volt. Ezt követően a reverz transzkripció Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) felhasználásával, random hexamer priming alkalmazásával, a gyártó utasítása szerint zajlott.

Kvantitatív real time PCR és relatív kvantifikációs analízis

A kapott cDNS mintákból 2 ng kiindulási mennyiség felhasználásával kvantitatív realtime PCR módszerrel amplifikáción alapuló mennyiségi és minőségi analízist végeztünk LightCycler® 480 PCR rendszerben (Roche). A szöveti miRNS expresszió meghatározáshoz LNA™-val optimalizált, specifikus forward és reverz primereket (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark) használtunk. A PCR reakciót 20 µl végtérfogatban 96-well-es plate-en 5 µl templát cDNS (5nmol/µl), 10 µl PCR Master Mix, 2 µl miRNS-specifikus primer (5nmol/µl) (TIB Molbiol GmbH, Berlin) és 3 µl PCR grade

H₂O összetételben, standard LightCycler® 480 SYBR Green I Master PCR kit protokollja alapján LightCycler® 480 rendszerben (Roche) állítottuk össze. Belső kontrollként U6 és 5S rRNS-t (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark) használtunk. A PCR görbéket LightCycler 4.0 software-rel (Roche) analizáltunk. A relatív expressziós értékeket 5S rRNS és U6 snRNS expresszióra vonatkoztatva határoztuk meg deltaCp dinamikus korrekciós módszer segítségével. A PCR vizsgálatot egy sor negatív kontroll mellett, minden minta esetében technikai triplikátummal végeztük, három különböző PCR futási ciklusban.

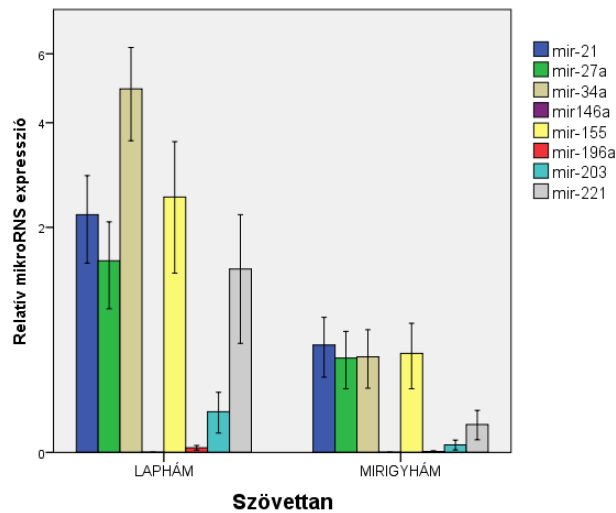
Statisztikai feldolgozás

Az eredmények kiértékeléséhez összetett statisztikai analízist végeztünk. Az eredményeket százalékban, átlagolva (\pm standard deviáció/SD) vagy mediánban (interquartilis távolság/IQT) adtuk meg. A folytonos változókat Student t teszt, egyirányú variancia-analízis (ANOVA) vagy Mann-Whitney U teszt segítségével hasonlítottuk össze, a kategorikus változók elemzése a χ^2 teszt alkalmazásával történt. Korrelációk vizsgálatát logisztikus regresszió számítás segítségével végeztük. A potenciális biomarkerek azonosítására ReceiverOperatingCharacteristics (ROC) Curve elemzést használtunk. Minden statisztikai művelet, számítás az IBM SPSS Statistics Version 21 software (Armonk, New York, USA) segítségével történt. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

Eredmények

A miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata cervix daganatokban

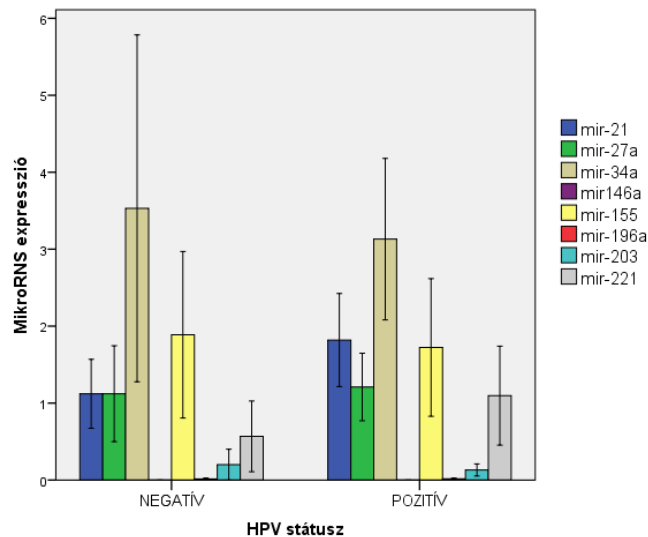
A vizsgált mikroRNS-ek expressziója kivétel nélkül minden esetben a laphám típusú daganatokban volt magasabb (1. ábra), a két, vizsgált hisztológiai típus vonatkozásában a legnagyobb eltérést a miR-34a esetében találtuk, 4,86-szoros különbség ($p=0,001$) mellett. Az expressziós értékek átlagának alapján összevetve a lap- és mirigyhámsejtes cervixdaganatokat, az alábbi n-szeres eltéréseket tapasztaltuk: miR-21= 2,62 ($p=0,004$), miR-27a: 1,88 ($p=0,018$), miR-146a: 3,98, miR-155: 2,06 ($p=0,021$), miR-196a: 1,44 ($p=0,032$), miR-203: 2,75 ($p=0,037$), miR-221: 3,35 ($p=0,017$).



1. ábra: Szövetteni típus szerinti (SCC és ACC) miRNS expressziós eltérések (relatív expresszió, 5SrRNS), a hibásávok a 95%-os konfidencia intervallumot jelölik

Eltérő hisztológiájú és HPV státuszú cervixdaganatok miRNS expressziós mintázatának összehasonlítása

A HPV negatív ill. pozitív minták összehasonlításakor az alábbi megfigyeléseink voltak: a HPV pozitív csoportban magasabb szinten expresszálódott a miR-21, miR-27a, miR-146a, miR-196a és a miR-221, míg alacsonyabb értékeket kaptunk a miR-34a, miR-155 és a miR-203 esetében (2. ábra), ám statisztikailag nem szignifikáns mértékben.



2. ábra: MikroRNS expresszió HPV státusz szerint (HR HPV negatív ill. pozitív)

A HPV pozitív csoporton belül külön entitásként kezeltük az egyszeresen és többszörösen pozitív mintákat. MiR-21 és miR-27a esetében mirigyhámsejtes daganatokban az expressziót nem befolyásolta a HPV státusz. Laphámsejtes

daganatokban HPV negatív és egyszeres HPV pozitív mellett a miR-21 hasonló mértékben expresszáldott, míg többszörös HPV pozitív mellett 3,11-szeresére emelkedett az expresszió. MiR-27a esetében pedig 4,37-szeres különbség figyelhető meg az egyszeresen (medián: 0,563) és többszörösen pozitív (medián: 2,463) minták összehasonlításakor. A miR-34a expressziója fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott laphám és mirigyhámsejtes daganatok esetében is, a HPV negatív, egyszeresen és többszörösen HPV pozitív minták vonatkozásában. Laphámdaganatok miR-146a expressziójának vizsgálatakor kiugróan magas értéket kaptunk egyszeres HPV pozitív mintákban. Mirigyhámdaganatok esetén a legmagasabb expressziós értéket HPV negatív mintákban mértünk. MiR-155 esetében fokozatosan csökkenő expressziót találtunk laphámdaganatban. Mirigyhámsejtes daganat esetén az expresszió szintén a HPV negatív mintákban érte el a legmagasabb szintet, azonban többszörös pozitív mellett, egyszeres pozitívához képest, enyhén fokozódó expressziót találtunk. Mirigyhámsejtes daganatban a HPV státusz nem befolyásolta a miR-196a expresszióját, HPV negatív, egyszeresen és többszörösen HPV pozitív minták esetén is azonos mértékű miR-196a expressziót regisztráltunk. Laphámdaganatban a legmagasabb miR-196a expressziót egyszeres HPV pozitív mellett észleltük. MiR-203 expresszió vonatkozásában enyhén, de fokozatosan csökkenő expressziót találtunk laphámdaganatban a HPV státusz alapján történt összevetésben, ugyanakkor mirigyhámdaganatban kicsit eltérő trendet figyeltünk meg. A legmagasabb mértékű miR-203 expresszió itt is a HPV negatív csoportban volt, azonban többszörös HPV pozitív mellett, egyszeres pozitívához képest, enyhén fokozott expressziót láttunk. MiR-221 esetében egyszeres HPV pozitív mirigyhámdaganatban találtuk a legmagasabb expressziós értékeket, míg laphámdaganatban a miR-221 expressziója relatíve konstans értékeket mutatott. A HPV státusz függvényében egyedül a mérési adatok szórásában észleltünk eltérést.

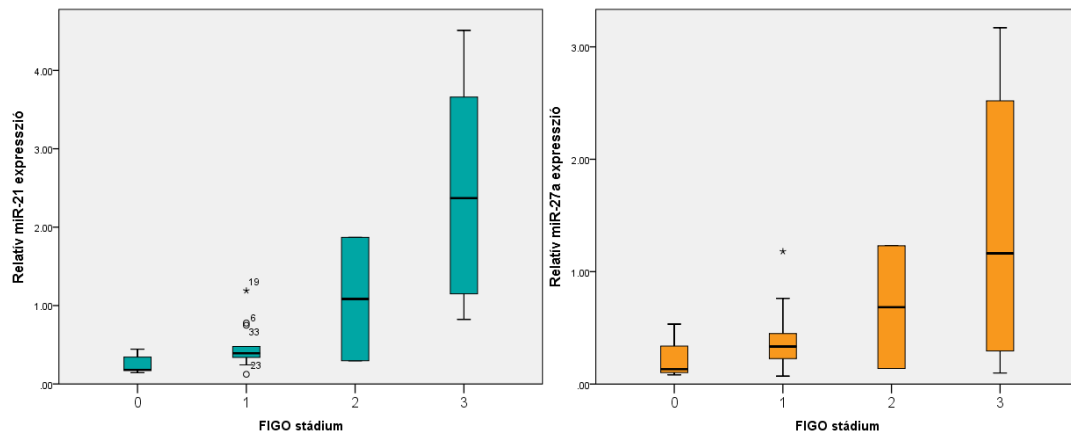
HPV16 pozitív mellett észlelt miRNS expressziós mintázat laphámdaganat esetén jellegzetes eltéréseket mutatott, ami a miR-27a, miR-203 és a miR-221 szintjén igazolódott. miR-21 esetében nem találtunk eltérést egyik szövettani típusnál sem HPV16 ill. egyéb HR HPV típusok kapcsán mért expressziós értékekben.

MiR-27a, miR-203 és a miR-221 vonatkozásában statisztikailag szignifikáns (miR-27a: $p=0,001$, miR-203: $p=0,003$ és a miR-221: $p=0,009$) különbségeket találtunk. Mirigyhámsejtes daganatnál, HPV16 pozitív kapcsán, nem találtunk szignifikáns eltéréseket a vizsgált miRNS-ek expressziójában.

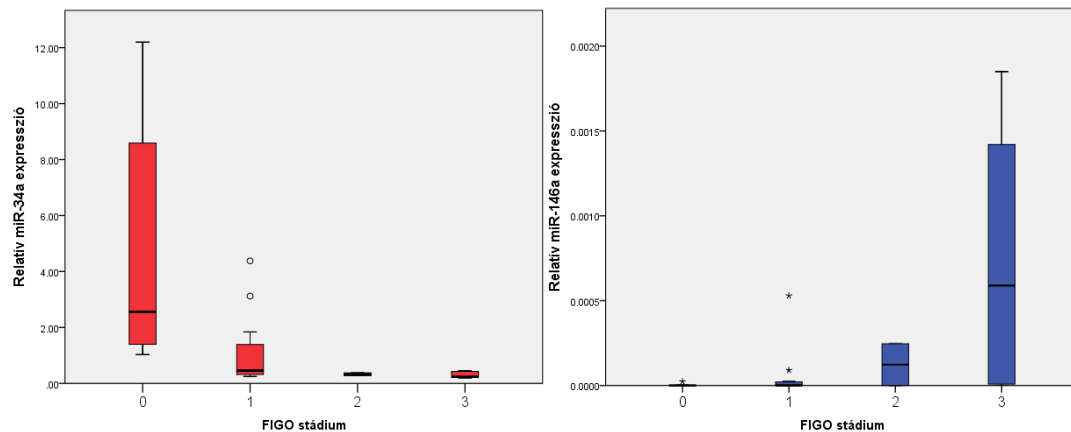
Statisztikai elemzés eredményeként a két leggyakoribb szövettani típus vonatkozásában a miR-21 ($p=0,007$), a miR-34a ($p=0,002$), a miR-155 ($p=0,003$), a miR-203 ($p=0,01$) és a miR-221 ($p=0,003$) esetében merül fel a biomarkerként történő alkalmazás lehetősége.

Különböző klinikai stádiumú (FIGO 0-III) cervixdaganatok miRNS expressziós mintázatának vizsgálata

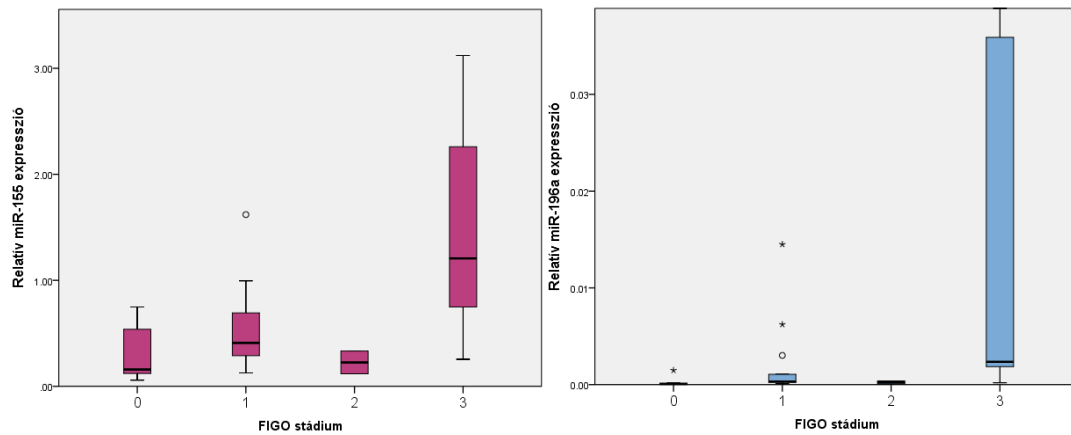
Az eltérő klinikai stádiumú betegektől származó szövettani minták (n=50) a nemzetközileg elfogadott, FIGO szerinti stádiumbeosztás alapján kerültek besorolásra (0: n=5, 10,87%, I: n=23, 50%, II: n=7, 15,22%, III: n=9, 19,56%, IV: n=2, 4,35%). A különböző stádiumokban disztinktív miRNS expressziós eltéréseket észleltünk. A miR-21 és miR-27a (3. ábra), miR-146a (4. ábra), miR-155 és miR-196a (5. ábra) és a miR-221 (6. ábra) esetében a betegség súlyosbodásával emelkedett az expresszió. Ugyanakkor ezzel ellentétes, azaz csökkenő tendenciát találtunk a miR-34a és a miR-203 esetében (4. és 6. ábra).



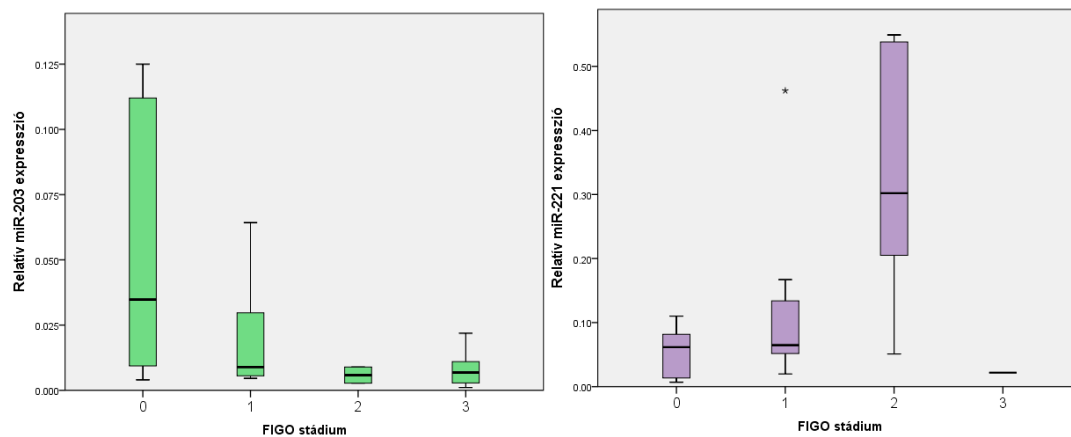
3. ábra: Relatív miR-21 és miR-27a expresszió medián értéke eltérő klinikai (FIGO 0-3) stádiumú cervix daganatokban.



4. ábra: Relatív miR-34a és miR-146a expresszió medián értéke eltérő klinikai (FIGO 0-3) stádiumú cervix daganatokban.



5. ábra: Relatív miR-155 és miR-196a expresszió medián értéke eltérő klinikai (FIGO 0-3) stádiumú cervix daganatokban.



6. ábra: Relatív miR-203 és miR-221 expresszió medián értéke eltérő klinikai (FIGO 0-3) stádiumú cervix daganatokban

Az általunk tapasztalt eltérések, több miRNS esetében is, statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak. A FIGO szerinti klinikai stádiumra vonatkozó csoportosítás alapján történt adatfeldolgozás (egyutas ANOVA) szignifikáns különbségeket írt le az egyes grade-ek között az alábbi miRNS-ek expresszióját illetően: miR-21 ($F=9,656$, $p=0,001$), miR-27a ($F=3,262$, $p=0,042$), miR-34a ($F=4,275$, $p=0,016$), miR-146a ($F=4,44$, $p=0,014$) és a miR-221 ($F=3,380$, $p=0,036$). A Tukey post-hoc teszt szignifikánsan magasabb miR-21 expressziót igazolt FIGO III-ban ($2,48\pm 0,65$) FIGO 0 ($0,256\pm 0,058$, $p=0,001$) és I ($0,474\pm 0,78$, $p=0,001$) stádiumokkal történt összevetést követően. MiR-27a esetében szignifikancia ($p=0,043$) a FIGO III ($1,401\pm 0,54$) és FIGO I ($0,401\pm 0,083$) viszonylatában állapítható meg. MiR-34a vonatkozásában FIGO III-ban ($0,307\pm 0,057$) szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk FIGO 0-hoz ($4,723\pm 1,87$, $p=0,028$) és FIGO I-hez ($1,092\pm 0,359$, $p=0,026$) képest. MiR-146a expresszió esetén szignifikánsan magasabb mértéket határoztunk meg FIGO III-t ($0,00074\pm 0,0003$) FIGO 0-al ($5,21\times 10^{-6}\pm 4,5\times 10^{-6}$, $p=0,033$) és I-el ($0,000053\pm 0,00004$, $p=0,013$) összevetve.

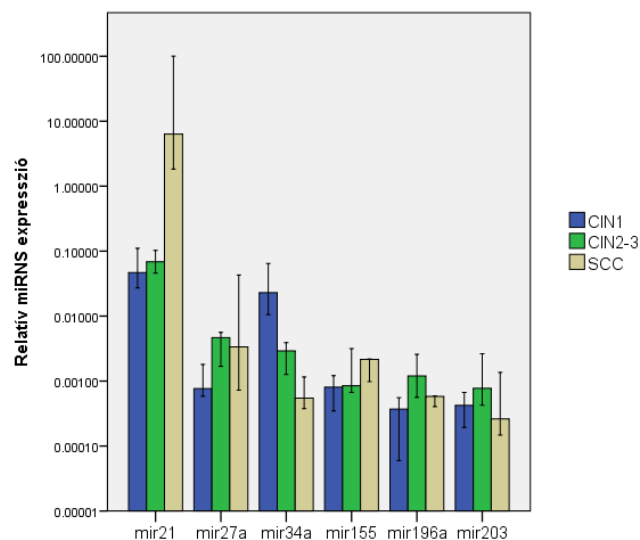
Magas onkogén kockázatú HPV pozitív cervicalis dysplasiák és invazív laphám daganat miRNS expressziós mintázatának vizsgálata

A HPV fertőzés előfordulási gyakorisága és jellemzői a vizsgált populációban

Munkánk második felében 100 db magas onkogén kockázatú HPV-re pozitív FFPE szövetblokk (CIN1-3 és SCC) feldolgozása történt meg. Az előzetesen felállított szövettani diagnózis alapján a következő csoportok kerültek meghatározásra a HR-HPV fertőzés (mono, multiplex) definiálása mellett: CIN1: 23%, CIN2-3: 34% és SCC: 43%. A HR-HPV pozitív enyhe és súlyos dysplasia és SCC esetében, egyszeres és többszörös fertőzést egyaránt figyelembe véve, a HPV 16 (57,35%) dominanciája igazolódott, melyet a 18-as és 31-es típusok (10,96%) ill. az 56 (9,59%) és 51, 52, 58 (8,22%) követett. A minták összességére vonatkozóan az egyszeres és többszörös HPV fertőzés aránya 2,33:1 volt.

A miRNS-ek expressziós mintázatának vizsgálata különböző súlyosságú, HR HPV pozitív hámelváltozásokban

Az onkomiR-ként ismert miR-21 és miR-155 esetében a hámelváltozások súlyosságával párhuzamosan fokozódó expressziós értékeket találtunk, ugyanakkor a tumorszuppresszor funkciójú miR-34a expressziója fokozatosan csökkent (7. ábra). A többi vizsgált miRNS (miR-27a, miR-196a és miR-203) expressziója CIN2-3-ban magasabb volt, mint CIN1-ben, azonban korai stádiumú laphám daganatokban alacsonyabb expressziós értékeket találtunk CIN2-3-hoz képest (7. ábra)



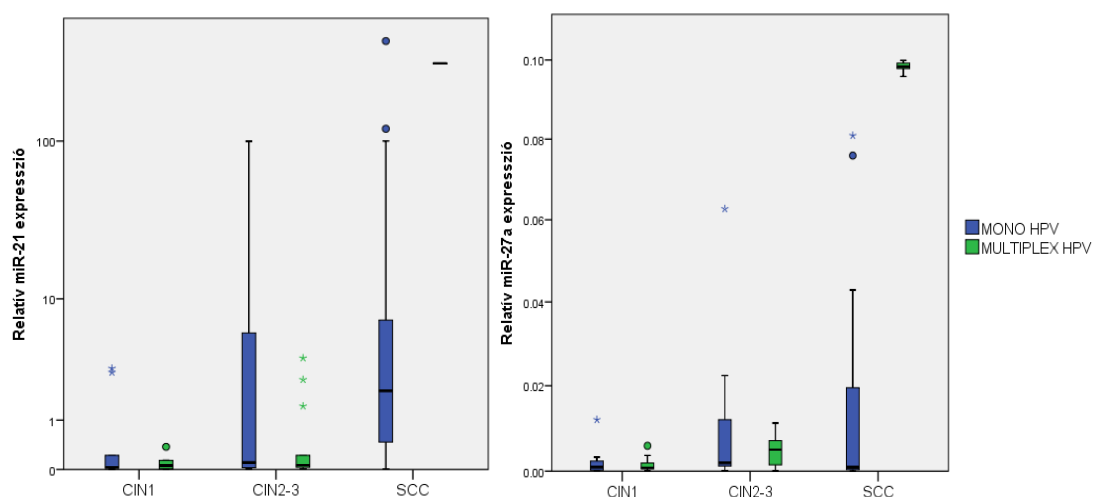
7. ábra: Relatív medián miRNS-expressziós értékek normalizációt követően logaritmikus skálán ábrázolva HR HPV pozitív humán cervix mintákban

A statisztikailag szignifikáns különbségeket illetően az alábbi eredményeket emelném ki. A miR-27a expressziója a progresszióval párhuzamosan szignifikánsan magasabb értékeket mutatott: CIN2-3 és CIN1 relációja ($p=0,023$), SCC és CIN2-3 relációja ($p=0,033$) (6. táblázat). Szintén a tranzíció előrehaladtával emelkedett a miR-155 expresszió mértéke, mely CIN1 ill. CIN2-3 viszonylatában bizonyult statisztikailag is szignifikánsnak ($p=0,023$). Ellentétes tendenciát mutatott a p53 útvonalhoz kötött gátlódó, tumor szuppresszor funkciójú miR-34a expressziója és szignifikánsan alacsonyabb volt CIN2-3-ban, mint CIN1-ben ($p=0,041$) valamint SCC-ben CIN2-3-hoz képest ($p=0,025$) (7. táblázat). A miR-196a expressziót illetően emelkedett értéket regisztráltunk CIN2-3-ban CIN1-hez képest, viszont a CIN2-3 és SCC átmenet között statisztikailag szignifikáns csökkenés ($p=0,016$) következett be.

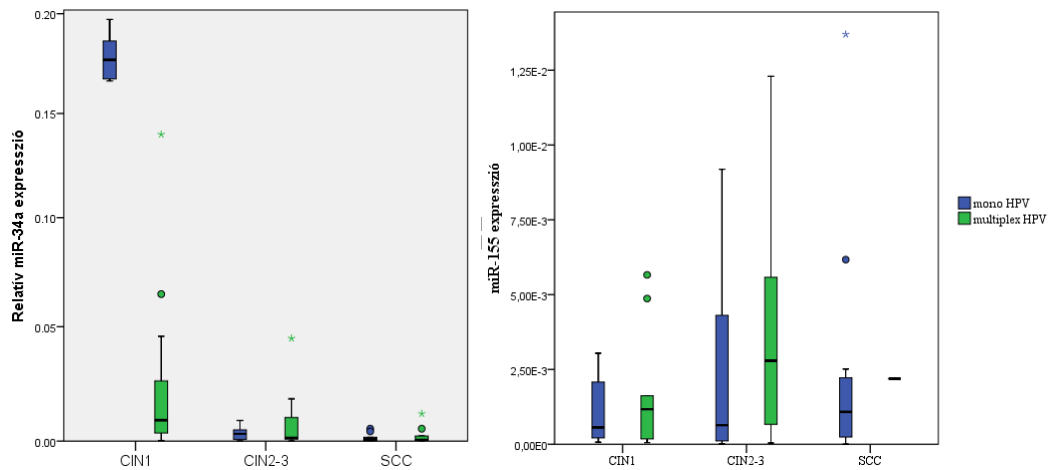
MiRNS expressziós mintázat vizsgálata HR HPV fertőzött, kóros, preneoplasztikus és neoplasztikus hámelváltozásokban – egyszeres és többszörös HPV ill. HPV16 pozitivitás

Egyszeres HR HPV pozitivitáshoz képest többszörös pozitivitásban magasabb expresszió igazolódott miR-27a, miR-34a, miR-155, miR-196a és miR-203 esetében. Többszörös HR HPV pozitivitás esetén a diszplázia súlyosságának fokozódásával egyre magasabb miR-27a expressziót találtunk. MiR-34a expresszió tekintetében a legnagyobb különbséget (csökkent expressziót) a többszörösen pozitív CIN1 ill. CIN2-3 mintáknál tapasztaltunk. MiR-155 és miR-196a esetében az expressziós mintázat egyszeres és többszörös HPV fertőzés esetén is azonos mértékben változott a malignus transzformáció fokozatainak viszonylatában (8-10. ábra).

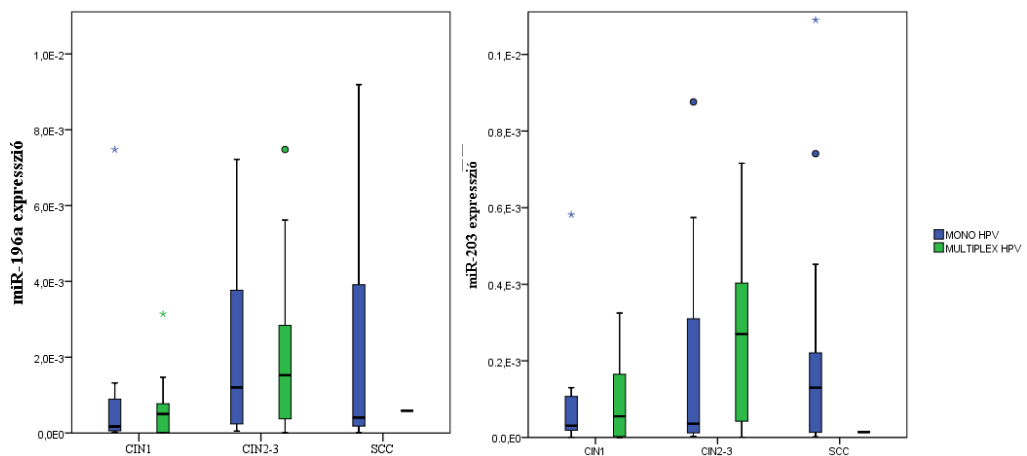
Az észlelt eltérések összefüggtek a HR HPV pozitivitás jellemzői közül az egyszeres ill. többszörös HPV jelenlétével, a korreláció szignifikáns volt nem csak a miR-34a ($p=0,045$), de a miR-27a oncomiR esetében is ($p=0,029$) (logisztikus regresszió).



8. ábra: MiR-21 (log₁₀ skálán az y-tengelyen) és a miR-27a relatív expresszió a hámelváltozások súlyosságának megfelelő csoportok szerint.



9. ábra: MiR-34a és miR-155 relatív expresszió a hámváltozások súlyosságának megfelelő csoportok szerint.



10. ábra: MiR-196a és miR-203 relatív expressziós értékeinek átlaga (lineáris skálán az y-tengelyen) dysplasia súlyossága és egyszeres ill. többszörös HPV jelenléte szerinti bontásban.

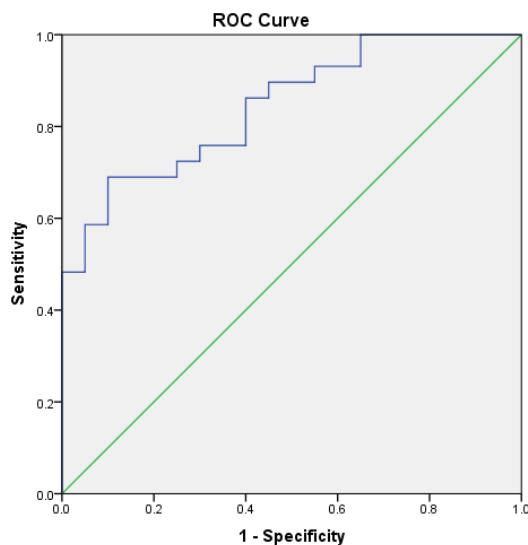
Többszörös HR HPV pozitívás esetén a CIN1/CIN2-3 összevetésekor szignifikáns eltérések igazolódtak a miR-27a ($p=0,001$), miR-34a ($p=0,001$) és miR-203 ($p=0,025$) kapcsán. SCC/CIN2-3 viszonylatában pedig a miR-21 ($p=0,002$) és a miR-27a ($p=0,001$), míg CIN1/SCC összehasonlításban a miR-21 ($p=0,001$), miR-27a ($p=0,001$) és miR-34a ($p=0,001$) esetében regisztráltunk szignifikáns különbségeket.

A feldolgozott mintákban a HPV 16 pozitívás aránya a következőképpen alakult: CIN1: 39%, CIN2-3: 65%, SCC: 72% (2. ábra). A HPV16 jelenléte egyértelműen befolyásolta a betegség kimenetelét ($p=0,004$). A miR-21 expressziója HPV16 negatív minták esetén magasabb, ám bár statisztikailag nem szignifikáns eltérést igazolt CIN1, CIN2-3 és SCC esetében is.

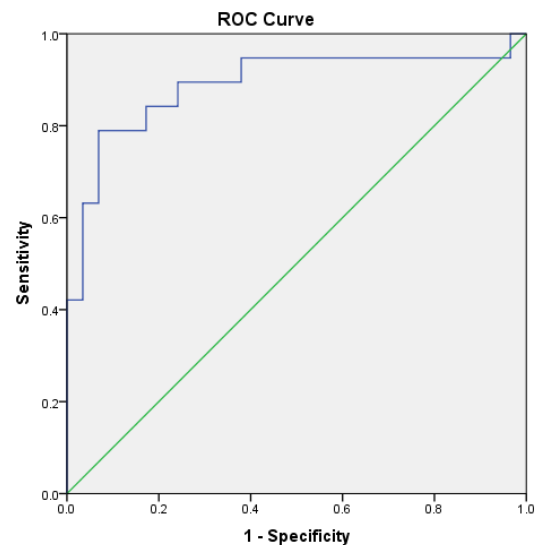
Ugyanakkor a CIN1/CIN2-3 összehasonlításban a HPV16 pozitivitás függvényében változott a miR-27a ($p=0,028$) és a miR-34a ($p=0,036$) expresszió, ami a CIN2-3/SCC viszonylatában miR-27a esetében ($p=0,027$) is beigazolódott. MiR-34a expressziója a HPV16 státusz alapján nem mutatott jelentős eltéréseket CIN2-3 és SCC-ben, míg CIN1-ben szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,036$) értéket találtunk HPV16 pozitivitás mellett. MiR-155 esetén a HPV16 jelenléte szignifikánsan nem befolyásolta az expressziót preneoplasztikus és korai neoplasztikus hámelváltozásokban. MiR-196a esetén a HR HPV típusától függetlenül hasonló mértékű expressziót mértünk a preneoplasztikus és korai neoplasztikus hámelváltozásokban. A miR-203 HPV16 pozitív CIN1 és CIN2-3 minták esetében is hasonló mértékben expresszálódott, de magasabb szintet találtunk SCC-ben.

Lehetséges miRNS biomarkerek azonosítása

A potenciális biomarkerek azonosításához ROC Curve analízist végezve megállapítottuk, hogy HR HPV fertőzés következtében kialakult diszplasztikus hámelváltozások súlyossági szintjük szerint jó hatékonysággal elkülöníthetők. Erre leginkább két miRNS, a miR-27a és miR-34a expressziós változásait találtuk alkalmasnak. Ennek a két miRNS-nek az expresszióját párhuzamosan monitorizálva igen jó hatékonysággal el tudtuk különíteni a HPV indukálta, különböző súlyossági fokot mutató hámelváltozásokat. Jelen vizsgálataink alapján egyértelműen megállapítottuk, hogy elsősorban korai SCC és súlyos fokú dysplasia (CIN2-3) közti elkülönítéséhez megfelelő a vizsgálat szenzitivitása és specifitása, AUC (Area under the curve)=0,889 (88,9%), 95%-os konfidencia intervallum: 0,779-0,999, $p=0,001$ (12. ábra). Ugyanakkor alacsonyabb hisztológiai grade esetén, az enyhe (CIN1) és súlyos fokú (CIN2-3) dysplasia differenciálásakor kapott AUC érték: 0,845 (84,5%) már kevésbé tükrözött kellően magas szenzitivitást és specifitást (11. ábra).



11. ábra: Enyhe (CIN1) és súlyos (CIN2-3) dysplasia elkülönítése szöveti miR-27a és miR-34a expresszió alapján.



12. ábra: Korai SCC és súlyos dysplasia (CIN2-3) elkülönítése miR-27a és miR-34a expresszió alapján.

Eredmények megbeszélése

Cervixdaganatok vizsgálata hisztológia, HPV státusz és klinikai stádium függvényében

A poszttranszkripcionális génszabályozásért felelős mikroRNS-ek daganatképződésben játszott patogenetikai szerepét az utóbbi években egyre több tudományos eredmény alátámasztotta. Kifejeződésük és funkciójuk szerint onkogén és tumorszuppresszor tulajdonságú miRNS-eket különböztetünk meg, mely azonban nem obligát módon jelenik meg minden daganattípus esetén. A miRNS szabályozás komplexitását fokozza a lehetséges targetek számának változékonysága is. A szöveti szinten expresszálódó miRNS-ek nem csak daganatspecifikusak, de a malignus transzformáció egyes lépéseire is jellemző mintázatot mutathatnak. Ennek pontos ismerete megalapozhatja sikeres klinikai applikációjukat a prevenció minden területén. Munkánk során a méhnyak daganatának vonatkozásában az elsők között tanulmányoztuk konkrét miRNS-ek expressziós mintázatának változásait. Ennek érdekében kizárólag humán szövetminták elemzésére szorítkoztunk és az egyszerű hozzáférhetőség ill. gazdag klinikai háttéranyag birtokában a formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetblokkok feldolgozása mellett döntöttünk. Ezt a döntésünket két szempont is meghatározta: 1. az ezt megelőzően megjelent, cervixdaganat kapcsán közölt irodalmi adatok elsősorban sejtkultúrákban és különböző sejtvonalakban tapasztalt eltéréseket mutattak be, 2. más szolid daganattípus esetén már történtek miRNS expresszió feltérképezésére irányuló vizsgálatok (kvantitatív PCR, nem pedig teljes miRNS-profil elemző microarray analízis), amik igazolták, hogy a mRNS-ekkel ellentétben a miRNS-ek formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákban és friss fagyasztott mintákban egyaránt intaktak maradnak és jól vizsgálhatók.

Az általunk alkalmazott protokoll során a metszetekből deparaffinálást követően totál RNS-t izoláltunk majd reverz transzkripció és valós idejű qPCR rendszerben, specifikus primerekkel végzett amplifikációt hajtottunk végre. Eredményeink relatív kvantifikáción alapulnak, normalizáláshoz a két használt „housekeeper” közül (5S rRNS és U6) végül az alkalmasabbnak vélt 5S rRNS-t használtuk és a relatív expressziós értékeket 5S rRNS expresszióra vonatkoztatva határoztuk meg deltaCp dinamikus korrekciós módszer segítségével. Több szempontra kiterjedő statisztikai analízis alapján számos statisztikailag szignifikáns eltérést sikerült igazolnunk.

A HR HPV fertőzések kiemelkedő fontosságú etiológiai tényezőnek számítanak a cervixben lejátszódó karcinogenezisben. Éppen ezért külön figyelmet szenteltünk mintáink HPV státuszának pontos meghatározására (Genoid Kft, Budapest). Ezt megelőzően szövettani morfológiai jelek alapján igyekeztünk eltérő HPV státuszú mintákat kiválasztani, lehetőséget teremtve a HPV negatív és pozitív minták közti eltérések felfedezésére. A HPV genotipizálás egyértelműen a leggyakoribb magas onkogén kockázatú HPV16 és 18 típusok dominanciáját, azon belül is kiemelkedően a

HPV16-ét, támasztotta alá. Laphámkarcinóma esetén a HPV pozitív minták között gyakoribb volt a HPV16 pozitivitás, mint a mirigysejtes mintákban. HPV18 pozitivitás jelentősen gyakoribbnak bizonyult adenokarcinómában. A vizsgált két leggyakoribb szövettani típusú cervix daganat (SCC és ACC) esetében a korábbi közleményekkel megegyezően jelentős különbséget találtunk az általunk vizsgált minták HPV16 és HPV18 pozitivitás arányát illetően. A demográfiai jellemzők közül a betegek átlagéletkorának vizsgálata az irodalmi adatoknak megfelelően alacsonyabb átlagértéket igazolt ACC esetén, mint SCC-ben.

A két leggyakoribb hisztológiai típus összehasonlításakor jellegzetes, szignifikáns különbségeket találtunk, amit HPV státusz függvényében (egyszeres és többszörös, valamint HPV16 pozitivitás) is kielemeztünk, ami irodalmi újdonságnak számít. Az eltérő hisztológia a miRNS expresszió mértékét és arányait tekintve is jelentős eltéréseket eredményezett, melynek háttérében a vizsgált onko- és tumorszuppresszor miRNS-ek különböző aránya figyelhető meg. Laphám típus esetén magasabb expressziót találtunk az összes vizsgált miRNS tekintetében. Mirigyhámsejtes daganatban alacsonyabb oncomiR expresszió mellett jóval alacsonyabb volt a tumorszuppresszor funkciójú miR-34a expressziója. A HPV E6 p53 celluláris transzkripciós faktor révén (p53 kötőhely a miR-34a promotor régióban) gátolja a miR-34a expressziót. Ez a magyarázata annak, hogy normál, HPV pozitív epitheliumban is alacsonyabb a miR-34a expresszió mint HPV negatívban, amit a neoplasztikus átalakulás átesett epithelium esetében sikerült is igazolnunk. In vitro, többféle sejtvonalban (SiHa, CaSki, HeLa, C33-A) is igazolták, hogy a miR-34a és miR-34c fokozott expressziójának apoptózist serkentő hatása cervixdaganatban általános érvényű. Ugyanakkor arra az aspektusra is érdemes kitérni, melyet Lu és mtsai a miR-34a gén szintjén vizsgáltak. Ez alatt a HPV integráció eltérő módzatait és transzkripciós hatásaikat értjük, hiszen az integráció következtében nemcsak a virális onkogének expressziója, de a gazdasejt génexpressziós mintázata is módosulhat még akkor is, ha intron szekvenciák érintettek.

A daganatos minták esetében a HPV jelenléte nem okozott jelentős különbségeket, de kiemelendő, hogy HPV pozitivitás mellett a magasabb oncomiR expresszió alacsonyabb miR-34a expresszióval társult, ami a p53 asszociáció révén egyértelműen a HPV jelenlétét igazolja. A daganatos elváltozásokban elsősorban oncomiR-ként definiált miR-155 az apoptózis, a proliferáció valamint a migráció és invázió befolyásolása révén fejt ki hatását. Ugyanakkor az immunreakciók szabályozásában is igen jelentős szerepet játszik. Expressziójának fokozódását az immunsejtek aktivációjakor figyelték meg. A HPV negatív-pozitív minták elemzésekor a pozitív mintákban regisztrált alacsonyabb miR-155 expresszió egyrészt az immunválasz "csendesítésére", másrészt már a progresszió jeleire is utalhat. Az általunk talált HPV pozitív daganatokra jellemző alacsonyabb miR-203 expresszió megerősíti a korábban feltételezett, a HPV E6/E7 onkoproteinek által downregulált, a cervixdaganatok kapcsán tumorszuppresszorként definiált miR-203 karcinogenezisben játszott szerepét.

Az egyes miRNS-ek expressziójának kiértékelésekor szövettani típus valamint a HPV pozitívitas jellegének vonatkozásában azonban jellegzetes összefüggések igazolódtak. Az egyszeresen és többszörösen HPV pozitív mintákat összehasonlítva laphámkarcinóma esetében ez a miR-21 és a miR-27a fokozott expresszióját, valamint a miR-146a és a miR-196a csökkent expresszióját jelentette többszörös HPV pozitívitas mellett. A miR-21 cervixdaganatban a p53 útvonal negatív regulátora egyrészt a HNPRK fehérje (p53 pozitív regulátora) expressziójának modulálása révén, másrészt a p63 szabályozása által. A miR-21 egyben a PDCD4 tumorszuppresszor gén negatív regulátora. Lerner és mtsai az FBW7 egyik fő upstream regulátoraként (többek mellett a p53 is ilyen) azonosították a miR-27a-t (szuppresszor), ezzel hozzájárulva a cyclin E degradáció és a sejtciklus progresszió (G1/S fázis átmenet) finomhangolásához. A miR-27a másik valószínűsített targetje a COX-2 promotereként ismert EGFR, amit szintén laphám eredetű daganat (HNSCC) kapcsán már igazoltak. Cervixdaganatban erre vonatkozóan nincs irodalmi adat, a hatásmechanizmus jelenleg ismeretlen. A fokozott COX-2 expresszió cervix karcinómában a kemorezisztencia és rossz túlélés prognosztikus jelzője. Greco és mtsai pedig HPV16 E5 transzfektált HaCaT humán keratinocytákban igazoltak fokozott miR-146a expressziót, melyet az E5 indukciós hatásának tulajdonítottak, ami nagy valószínűséggel szintén hozzájárul a HPV infekciókban tapasztalt csökkent immunválaszhoz. Érdekességképp, HPV pozitív léziók esetében a környező szövetekben nem láthatóak gyulladási jelek, ami többek között a HPV E5, E7 onkoproteinek hatására bekövetkező sejt felszíni MHC I és MHC II downregulációjának és az emiatt csökkent antigén-felismerő kapacitásnak tudható be. Woodman és mtsai szerint az E5 fehérjének amúgy nincs vagy csak nagyon gyenge az immunogenitása, HPV16 pozitív betegekben nem is mutatható ki E5 elleni antitest, ami a magas arányú E7 antitestek jelenléte mellett kifejezetten figyelemre méltó. Az immunfolyamatok regulációja mellett a miR-146a expresszió a sejtproliferációs rátára is hatással van. A cervikális karcinogenezisben is jelentős szerepe van az emelkedett miR-146a expresszióknak a proliferáció turnoverének fokozásában. Részben hasonló hatást vált ki a miR-196a, csak a PI3K/Akt jelátviteli útvonal szabályozása révén, előmozdítva a G1/S-fázis átmenetet és a proliferációs aktivitást. Villegas-Ruiz és mtsai az embrionális fejlődésben és a celluláris remodellingben szerepet játszó HOXC8 gént validálták még miR-196a targetként cervix daganatban. Mirigyhámsejtes daganatban alacsonyabb miR-221 expressziót találtunk többszörös HPV jelenlétekor. A miR-221, cervikális karcinogenezis szempontjából kulcsfontosságú E2F/RB jelátviteli útvonalra gyakorolt pozitív hatását (RB1 gátlása révén aktiválja az E2F útvonalat) nemrégiben igazolta Lupini és mtsai in vitro rendszerben. Érdekes, hogy éppen a szorosán a HPV fertőzés kapcsán csökkenő expressziót mutató miR-34a expressziójában nem volt az egyszeresen és többszörös fertőzések esetében különbség. A későbbiekben, amikor a HPV indukálta malignus transzformáció lépéseit vizsgáltuk, a diszplázia fokával és a többszörös HR HPV jelenlétével kapcsolatban már eltérő miR-34a expressziós értékeket találtunk. Cervixdaganatban, akárcsak a vizsgált mintákban, a leggyakrabban azonosított onkogén típus a HPV16. HPV16 jelenlétének függvényében laphám daganat esetén jellegzetes eltéréseket észleltünk a miR-27a, a miR-203 és a miR-221 expresszió

esetében. Az onkomiR jellegű, p53, E2F és c-Myc által modulált mir-27a expressziója HPV16 pozitív laphám daganat esetén szignifikánsan alacsonyabb volt, aminek háttérében a HPV16 E6 és E7 által kifejtett hatás eredményeként felerősödő c-Myc transzaktiváció állhat. Ugyanakkor szintén HPV16 pozitívitas aspektusából vizsgálva, mirigyhámsejtes daganat esetén nem találtunk eltéréseket az általunk vizsgált miRNS-ek expressziójában.

A cervixdaganat klinikai stádiumaival párhuzamosan fokozatosan magasabb miR-21 expressziót sikerült igazolni. Lao és mtsai a miR-155-öt onkomiR-ként azonosították SiHa és HeLa sejt kultúrákban végzett kutatásaik alapján, mivel hozzájárult a daganatos sejtek proliferációjához és csökkent expresszió esetén fokozódott az apoptózis valamint a sejt ciklus is leállt. Az apoptotikus folyamatok visszaszorításához nagymértékben hozzájárul, melynek háttérében nagy valószínűséggel egyrészt a kaszpáz-3 aktivitás gátlása (TP53INP1 közvetítéssel), másrészt az LKB1 gén expressziójának modulálása állhat. A daganat progressziójában igen fontos migrációs és inváziós képességet in vivo vizsgálva miR-155 overexpresszió esetén csökkent migrációs és inváziós hajlamot igazoltak.

Eredményeink alapján a vizsgált miRNS-ek csoportjából a miR-21, a miR-34a, a miR-155, a miR-196a, a miR-203 és a miR-221 esetében vetődik fel a lehetséges biomarkerként történő alkalmazás lehetősége.

Magas onkogén kockázatú HPV pozitív cervicalis dysplasiák és invazív laphám daganat miRNS expressziós mintázatának vizsgálata

A HPV pozitív preneoplasztikus és korai laphám daganatot vizsgálva eredményeink összecsengenek Trottier és mtsai által közölt, brazil populáción végzett vizsgálataival, melyben 2462 nő adatait dolgozták fel. Az általuk bevont, nagyrészt a kaukázusi rasszhoz tartozó, nők átlag életkora 32,8 év volt. Esetünkben a teljes HR HPV pozitív betegpopuláció átlagéletkora 36,17 év (18-65 év) volt és szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott többszörös HPV pozitívitas mellett ($33,3 \pm 8,0$ összevetve $38,0 \pm 10,5$, $p=0,039$). Ez a megfigyelés a diszplázia fokával párhuzamosan alakult és minden szövettani alcsoport esetében igaznak bizonyult, egyetlen kivételtől eltekintve: CIN1 csoport, ahol mono-HPV: $33,2 \pm 8,8$ és multiplex HPV: $33,2 \pm 10,2$ eredményeket kaptunk. Ezek az eredmények megerősítik a fiatalkori szervezett népegészségügyi valamint az opportunisztikus szűrővizsgálatok jelentőségét és az érintett célpopuláció részvételi arányának valamint átszűrtségének növelésére irányuló törekvések kulcsfontosságát.

A HR HPV pozitív preneoplasztikus és korai laphám daganat esetében, egyszeres és többszörös fertőzést egyaránt figyelembe véve, a hazai irodalmi adatoknak megfelelően, a HPV16 (57,35%) dominanciája igazolódott, melyet a 18-as és 31-es típusok (10,96%) ill. az 56 (9,59%) és 51, 52, 58 (8,22%) követett. Ezek az eredményeink is alátámasztják a 2014/2015-ös tanévben bevezetésre került, kötelező tájékoztatáson és

önkéntes alapon megvalósuló iskolai kampányoltás fontosságát, a bevezetés időszerűségét. Az effektív primer prevenció érdekében elengedhetetlen a magas átoltottsági arány elérése az oltási célcsoportban.

A vizsgált mikroRNS-ek expressziós eltéréseinek vonatkozásában eredményeink a cervikális transzformáció során egyre fokozódó miR-21 expressziót igazoltak, mely összhangban áll korábbi, kisebb esetszám mellett, CIN és SCC betegek analízisekor tapasztaltakkal. Perzisztáló HPV fertőzés talaján létrejövő malignus transzformáció során fokozatosan csökkenő miR-34a expressziós értékeket mértünk. Azonban mindenképp ki kell emelnünk, hogy ez elsősorban a korai, még jelentős mértékben reverzibilis fázisra (CINI és CINII-III közti átmenet) volt jellemző. A diszplázia fokozódásával, a transzformáció előrehaladtával ez már szintén nem volt specifikus. Eredményeink alapján a karcinogenezis kezdeti fázisaiban hangsúlyosabb a miR-34a szerepe, ami többszörös HPV fertőzés esetén fokozottan érvényesül. Ismert tény, hogy a HPV infekció által befolyásolt p53-network szabályozása alatt kulcsfontosságú szabályozó funkciók érintettek, többek között a celluláris stabilitás és stressz válasz szempontjából meghatározó jelentőségű apoptózis, G1-arrest, DNS repair és szeneszcencia részfolyamatai és egyensúlya esetében. A miR-34a által szabályozott célmolekulák ill. azok szerepe még mindig nem teljesen ismert, bár egyes vizsgálatok már megnevezik a lehetséges közvetlen és közvetett targeteket. Ilyen például az E2F3 és azon keresztül a survivin expressziójának szabályozása, melynek révén a sejtek életképességét és inváziós készségét befolyásolja. Az általunk észlelt expressziós változások egyértelműen alátámasztják a miR-34a tumorszuppresszor funkcióját HPV indukálta cervikális transzformációban. Ugyanakkor ezek egyértelműen összefüggtek a HR HPV pozitívitás jellemzői közül az egy ill. több HPV típus jelenlétével, mely korreláció szignifikáns volt nem csak a miR-34a, de a miR-27a onkomiR esetében is. A miR-34a expressziós mintázatot a sejtproliferáció serkentésében szerepet játszó miR-27a expresszióval egyidejűleg figyelembe véve feltételezhető a többszörös HPV fertőzés szinergista hatása (produktív replikáció). Eredményeink összességében megerősítik a többszörös HPV fertőzések szinergista hatásának teóriáját a cervikális karcinogenezis során továbbá felvetik biomarkerként való alkalmazásuk lehetőségét.

HPV16 jelenlétének vonatkozásában az onkomiR jellegű, p53, E2F és c-Myc által modulált mir-27a expressziója HPV16 pozitív súlyos diszplázia-laphám daganat átmenet esetén szignifikánsan lecsökkent, aminek háttérében a HPV16 E6 és E7 által kifejtett hatás eredményeként felerősödő c-Myc transzaktiváció állhat.

A szöveti miR-196a expresszióra vonatkozó vizsgálataink során jelentősen magasabb esetszám mellett megerősítettük Pereira és mtsai korábbi eredményeit, miszerint az enyhe és súlyos diszplázia viszonylatában emelkedik, majd korai laphámdaganat esetében csökken az expresszió mértéke. A HR HPV infekció tulajdonságaira fókuszálva igazoltuk, hogy az egyszeres és többszörös HPV pozitívitás és a típusbeli különbségek nem befolyásolják ezeket az expressziós eltéréseket. Ezt különböző klinikai stádiumú HPV pozitív laphámdaganatok esetében is megerősítettük. Ezen

eredményeink alapján a miR-196a egy, a HR HPV pozitív minták esetében széles körben alkalmazható biomarker lehet, mivel expressziójára nem gyakorolnak hatást a HPV fertőzés kvalitatív, kvantitatív tulajdonságai.

Magas miR-203 expresszió esetén a vírus perzisztálását elősegítő folyamatok gátlódnak, melyet alátámasztott a transzformáció előrehaladtával észlelt, csökkenő miR-203 expresszió. Cervixdaganat esetén a downreguláció mértéke korrelált a nyirokcsomómetasztázisok stádiumával, ami a progresszió során gyakorolt összetett hatásainak eredményét tükrözi. A miR-203 által szabályozott gének egyikét már Melar-New és Laimins sikeresen identifikaálta, ez pedig a p63 gén. A P63 fehérje a P53 fehérjecsald tagja és a bazális sejtek proliferációjának fenntartásáért felelős transzkripciós faktorok egyik fontos képviselője. Normál keratinocyták differenciációjá során a p63 expresszió szintje folyamatos csökkenést mutat az alig kimutatható értéktartományig. Vizsgálataik szerint a HPV pozitív sejtek differenciációjakor azonban ez a csökkenés korántsem ilyen drámai és jóval magasabb szinten állandósul, mivel a HPV késői virális funkcióinak aktivációjához nélkülözhetetlen. Ezen a génexpresszió és a genom amplifikációjának indukcióját értjük, melynek pontos mechanizmusa még ismeretlen. Ugyanakkor a miRNS szabályozás hálózatszerű komplexitását figyelembe véve a szabályozásban részt vevő molekulák köre még számos lehetséges célmolekulával és szabályozó miRNS-sel bővíthet a közeljövőben. Zhu és mtsai nemrégiben cervixdaganat esetén in vitro és in vivo körülmények között is igazolták, hogy a miR-203, downstream targetjén (VEGFA) keresztül, gátolja a tumornövekedést és az angiogenezist. A miR-203 és a VEGFA közt reciprok jellegű szabályozó mechanizmusok működnek. Ez a fehérje az endothel sejtekre fejt ki változatos hatását (fokozza a vaszkuláris permeabilitást, vazodilatátor, angio- és vaszkulogenezist, sejtnövekedést indukál, elősegíti a migrációt, antiapoptotikus hatású).

A miRNS-ek expressziós mintázatának megváltozása manapság már jól ismert különböző malignus elváltozások vonatkozásában. A magas onkogén kockázatu vagy más néven high-risk (HR) HPV típusok kiemelkedő etiológia szerepét méhnyakdaganat vonatkozásában számos epidemiológiai és biológiai vizsgálat igazolta az utóbbi években. Azonban attól sem szabad eltekintenünk, hogy a HR HPV infekció nem obligát módon fejlődik invazív cervixdaganattá. Mindazonáltal egészséges fiatal nőkben, perzisztens fertőzés kialakulása szempontjából mindenképp magasabb rizikónak tekintjük a többszörös HPV pozitivitást, valamint a koinfekciókban a HPV16 típus jelenlétét. A miR-27a és miR-34a expresszió esetében kapott eredményeink (HPV16 és többszörös HPV pozitivitás vonatkozásában) ezeket a nézeteket erősítették meg. Összességében elmondható, hogy a miRNS-ek biomarkerként kerülhetnek bevezetésre akár önállóan, de a már jelenleg is a klinikai gyakorlatban használt módszerek kiegészítőjeként is és számos lehetőséget rejtenek magukban. Tekintettel az egyéni varianciákból eredő esetleges diszkrepanciákra illetve az expressziós vizsgálatokra jellemző korlátozott, relatíve alacsony esetszámmra, eredményeink széleskörű, általános alkalmazhatóságának alátámasztása további tudományos megerősítést igényel.

Új eredmények összefoglalása

I. Meghatároztuk a vizsgálati mintáink HPV státuszát és annak jellemzőit (genotípus, egyszeres ill. többszörös HPV pozitívitas)

II. Különböző hisztológiájú (laphám és mirigyhám) és eltérő HR HPV státuszú (negatív, egyszeresen és többszörösen HR HPV pozitív ill. HPV16 pozitív) cervixdaganatok esetében, relatív kvantifikáción alapuló, SYBR-Green technikával történő detekció során, előre kiválasztott miRNS panelen, qRT-PCR módszerrel szignifikáns eltérések igazolódtak (miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-203, miR-221), mely validálást követően differenciáldiagnosztikai marker lehet a jövőben.

III. Különböző klinikai stádiumú (FIGO 0-III) cervixdaganatokban jellegzetes expressziós mintázatot figyeltünk meg a vizsgált miRNS-ek vonatkozásában (miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-146a, miR-203).

IV. Magas onkogén kockázatú HPV fertőzés által indukált korai (FIGO I) laphámdaganat és prekursor lézióira (CIN1-3) vonatkozó vizsgálatok elemzése során típusos eltéréseket azonosítottunk (miR-21, miR-34a, miR-155), amiket a HR HPV fertőzés egyszeres és többszörös jellege valamint a HPV16 jelenléte is befolyásolt (miR-27a, miR-34a). Ezen eredményeink alapján a miR-21, miR-27a onkogén szerepét igazoltuk a cervixben, továbbá megerősítettük a már eddig is a HPV fertőzéshez asszociált miR-34a tumorszuppresszor szerepét. A többszörös HPV infekciók esetén valószínűsíthetően fellépő szinergista hatást sikerült miRNS szinten (miR-27a és miR-34a) igazolnunk.

V. Eredményeink statisztikai kiértékelésekor nem találtunk összefüggést a vizsgált mikroRNS expressziós mintázat és a betegek demográfiai, szocioökonómiai ill. életmódjukra jellemző tényezőivel.

VI. HR HPV pozitív cervicalis intraepithelialis neoplasiák és korai laphámdaganatok esetében a miR-27a és miR-34a expressziós mintázat alapján felmerül ezen miRNS-ek biomarkerként történő alkalmazása, melynek további kiterjedt vizsgálata után a későbbiekben a HR HPV fertőzések kimenetelének megítélésére is lehetőség nyílhat.

Köszönetnyilvánítás

Munkám elkészítéséhez nyújtott segítségükért köszönetemet szeretném kifejezni:

- dr. Ember István professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak az Orvosi Népegészségtani Intézet Molekuláris Biológiai Laboratóriumában folyó tudományos kutatómunkába, és aki mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta munkámat és PhD hallgatói tevékenységemet.
- Témavezetőmnek, dr. Kiss István jelenlegi intézetvezető professzornak, aki töretlen lelkesedésével és magas színvonalú szakmai tapasztalatával segítette munkámat.
- Édesapámnak, dr. Gőcze Péternek, aki figyelmemet a méhnyakdaganatok irányába terelte, a klinikai adatgyűjtés feltételeit megteremtette és klinikusi szemléletével és kritikáival segítette a munkámat.
- dr. Gombos Katalinnak, aki erre a „pályára” csábított, szakmai támogatásával és baráti tanácsaival mindig mellettem állt és átlendített a nehézségeken.
- dr. Kovács Krisztinának az inspirációkért, aki dr. Kajtár Bélával, a PTE KK Pathológiai Intézetének adjunktusaiként kimagasló patológiai háttérrel biztosították.
- dr. Benczik Mártának, a Genoid Laboratórium vezetőjének a HPV genotipizálásban nyújtott gyors és készséges segítségéért.
- Az Orvosi Népegészségtani Intézetben dolgozó dr. Juhász Krisztinának, Brunnerné Bayer Zsuzsannának, Herczeg Mónikának és Szántódiné Molnár Ágnesnek. Hozzáértő, lelkiismeretes, precíz munkájukra és szakmai segítségükre mindig számíthattam.
- A Nemzeti Kiválóság Programnak, hogy munkámat az Apáczai Csere János doktorandusz ösztöndíjjal támogatták.

Köszönöm családom megértését, türelmét, biztatását, szerető támogatását.

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Gócze K, Gombos K, Pajkos G, Magda I, Ember Á, Juhász K, Patczai B, Ember I: Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában, *Orv Hetil*, 152, 633-641. (2011)

Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Kajtar B, Benczik M, Gocze P, Patczai B, Arany I, Ember I: Unique MicroRNA Expression Profiles in Cervical Cancer. *ANTICANCER RESEARCH* 33:(6), 2561-2567. (2013) IF: 1,872

Gocze K, Gombos K, Juhasz K, Kovacs K, Gocze P, Kiss I: MicroRNA expressions in HPV induced cervical dysplasia and cancer. *ANTICANCER RESEARCH* 35:(8), 523-530. (2015) IF: 1,872

Disszertációtól független publikációk

Marek E, Gócze P, Bózsza Sz, Molnár G, Stefanovits Á, Gócze K: A HPV fertőzéssel és méhnyakrákkal kapcsolatos ismeretek pécsi iskolások és szülők körében. *Magyar Epidemiológia* 7 (1): 35-42. (2010)

Gócze K, Gombos K, Juhász K, Ember I: Környezeti karcinogének korai hatásainak mikroRNS-alapú molekuláris epidemiológiai biomarkerekkel történő monitorizálása (új utak a primer prevencióban). *Magyar Epidemiológia* 8 (2): 83-96. (2011)

Marek E, Kricskovics A, Kiss I, Dergez T, Gocze P, Gocze K, Ember I, Rebek-Nagy G: Difficulties in the prevention of cervical cancer: Adults' attitudes towards HPV vaccination 3 years after introducing the vaccine in Hungary. *VACCINE* 29: (32) 5122-5129. (2011)

Marek E, Dergez T, Bozsza S, Gocze K, Rebek-Nagy G, Kricskovics A, Kiss I, Ember I, Gocze P: Incomplete knowledge – unclarified roles in sex education: results of a national survey about human papillomavirus infections. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER CARE* 20(6): 759-768. (2011)

Juhász K, Gombos K, Gócze K, Wolher V, Szirmai M, Révész P, Magda I, Sebestyén A, Ember I: Effect of N-methyl-N-nitrosourea on microRNA expression in CBA/Ca mice. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL AND OCCUPATIONAL SCIENCE* 1(2): 77-82. (2012)

Juhász K, Gombos K, Szirmai M, Révész P, Magda I, Gócze K, Ember I: DMBA induces deregulation of miRNA expressions of let-7, miR-21 and miR-146a in CBA/Ca mice. *IN VIVO* 26(1): 113-118. (2012)

Szirmai M, Juhász K, Bertha A, Gombos K, Gócze K, Magda I, Révész P, Ember I: Potential chemopreventive effect of “Procont” on miRNA expression in CBA/Ca mice.

EUROPEAN MEDICAL HEALTH AND PHARMACEUTICAL JOURNAL 3: 24-28.
(2012)

Wolher V, Gombos K, Juhász K, Gócze K, Kiss I, Tibold A, Szabó L, Sebestyén A, Huszár A, Németh Á, Ember I: The effect of flavonoid supplement on miRNS expression in B16 melanomatransplanted mice. JOURNAL OF PROACTIVE MEDICINE 1(1): 13-20. (2012)

Wolher V, Gombos K, Juhász K, Gócze K, Kiss I, Tibold A, Szabó L, Sebestyén A, Huszár A, Németh Á, Ember I: Flavonoid tartalmú táplálékkiegészítő miRNS expresszióra gyakorolt hatása B16 melanomával oltott egerekben. MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 9(2): 139-149. (2012)

Wolher V, Gombos K, Juhász K, Gócze K, Kiss I, Tóth J, Knapp V, Sebestyén A, Huszár A, Németh Á, Ember I: Növényi polifenol tartalmú krém miRNS expresszióra gyakorolt hatása B16 melanomával oltott egerekben. MAGYAR EPIDEMIOLOGIA 9(1): 25-34. (2012)

Gobel G, Szanyi I, Revesz P, Bauer M, Gerlinger I, Nemeth A, Ember I, Gocze K, Gombos K: Expression of NFkB1, GADD45A and JNK1 in Salivary Gland Carcinomas of Different Histotypes. CANCER GENOMICS AND PROTEOMICS 10(2): 81-87. (2013)

Gombos K, Horvath R, Szele E, Juhasz K, Gocze K, Somlai K, Pajkos G, Ember I, Olasz L: miRNA Expression Profiles of Oral Squamous Cell Carcinomas. ANTICANCER RESEARCH 33:(4) 1511-1517. (2013)

Juhász K, Gombos K, Szirmai M, Gócze K, Wolher V, Révész P, Magda I, Sebestyén A, Németh Á, Ember I: Very early effect of DMBA and MNU on microRNA expression. IN VIVO 27:(1) 113-117. (2013)

Juhász K, Tibold A, Huszár A, Gombos K, Gócze K, Sebestyén A, Németh Á, Ember I: Vörösiszap indukálta mRNS és miRNS expresszió változások vizsgálata CBA/Ca egerekben. MAGYAR EPIDEMIOLOGIA IX-X:(4-1) 29-40. (2013)

Tibold A, Juhasz K, Gombos K, Gocze K, Ember I: Red Sludge-induced mRNA and miRNA Expression Alterations in vital organs of CBA/Ca Mice. IN VIVO 28:(1) 55-60. (2014)

Stanitz E, Juhasz K, Gombos K, Gocze K, Toth C, Kiss I: Alteration of miRNA Expression Correlates with Lifestyle, Social and Environmental Determinants in Esophageal Carcinoma. ANTICANCER RESEARCH 35:(2) pp. 1091-1097. (2015)