

**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 allépolimorfizmusok a kolorektális daganatok prognózisát)? Különbözik-e a vizsgált allépolimorfizmusok 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 allépolimorfizmusok a fej-nyaki daganatok kialakulásának kockázatát)?
- Különbözik-e egymástól a különböző XRCC1 alléleket hordozó fej-nyaki daganatos betegek átlagos túlélése (befolyásolják-e a vizsgált allépolimorfizmusok a fej-nyaki daganatok prognózisát)? Különbözik-e a vizsgált allépolimorfizmusok 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 átlagéletkora $63,4 \pm 6,4$ 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).

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

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 allélpolimorfizmusok 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	<u>0,0057</u>
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	<u>0,0157</u>
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	<u>0,0099</u>
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.

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

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 allépolimorfizmus 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) allépolimorfizmusainak hatását elemeztük. Eset-kontroll vizsgálatunkban kolorektális daganatos betegek allémeioszlásait vetettük össze nem daganatos kontroll személyek allégyakoriságaival. 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.