

Molekuláris epidemiológiai módszerek alkalmazásának lehetőségei

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Kiss István

Programvezető: Prof. dr. Ember István

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

2000

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	5
II. Bevezetés	6
III. Háttér, előzmények	12
III.1. A daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálata	12
III.1.1. Genetikai és környezeti tényezők a daganatok kialakulásában	12
III.1.2. „Domináns jellegű” és „egyéni érzékenység jellegű” gének	14
III.1.3. Metabolizáló enzimek szerepe a karcinogenezisben	15
III.1.4. A vizsgálatainkban szereplő, daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásoló főbb genetikai polimorfizmusok	18
III.1.4.1. Glutathion-S-transzferázok	18
III.1.4.2. CYP1A1	23
III.1.4.3. CYP2E1	25
III.1.4.4. NAT2	27
III.1.5. p53 allépolimorfizmusok	29
III.1.6. A vastag- és végbéldaganatok molekuláris epidemiológiai sajátosságai	31
III.2. Génexpresszió-változások, mint a korai biológiai hatás markerei	35
III.3. Génamplifikációk, mint prognosztikus markerek	39
IV. Célkitűzések	40

V. <i>Anyag és módszer</i>	43
V.1. RNS-izolálás.....	43
V.2. DNS-izolálás PCR-hez (paraffinos blokkból, metszetből).....	43
V.3. DNS-izolálás (szövetmintából, tumorból).....	43
V.4. DNS-izolálás (vérből).....	43
V.5. Nukleinsavak blottolása, hibridizálás.....	43
V.6. Statisztikai módszerek.....	44
V.7. Kísérleti állatok, kezelési protokollok.....	44
V.8. Allélpolimorfizmusok vizsgálata.....	44
V.8.1. CYP1A1 (Ile/Val polimorfizmus).....	44
V.8.2. CYP2E1 (PstI polimorfizmus).....	45
V.8.3. GSTM1 (homozigóta 0 genotípus).....	45
V.8.4. GSTM1 – GSTT1 genotipizálás.....	45
V.8.5. p53 (72-es kodon Arg/Pro polimorfizmus).....	47
V.8.6. NAT2.....	47
V.9. K-ras pontmutációk vizsgálata.....	47
V.10. Comet-assay	49
V.11. Sejtek izolálása székletből.....	49
V.12. A 2x2 napos táplálkozási útmutató a DNS-lánc törések vizsgálatánál.....	49
VI. Eredmények, megbeszélés	51
VI.1. A daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálata.....	51
VI.1.1. GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 polimorfizmusok összefüggése a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatával.....	51
VI.1.2. K-ras mutációs státusz és a mutációk prognosztikus értékének vizsgálata.....	53
VI.1.3. K-ras pontmutációk jelenlétének összefüggése a metabolizáló enzimek polimorfizmusával.....	55
VI.1.4. A vastag- és végbéldaganatok összefüggése további metabolizáló enzimekkel (GSTT1 és NAT2) valamint a p53 tumor szuppresszor gén allélpolimorfizmusával	61

<i>VI.1.5. Genetikai polimorfizmusok, környezeti expozíció és a DNS-károsodások létrejötte közötti kapcsolat.....</i>	<i>66</i>
<i>VI.2. Génexpresszió-változások vizsgálata.....</i>	<i>70</i>
<i>VI.3. Génamplifikációk, mint prognosztikus markerek.....</i>	<i>77</i>
<i>VII. Az elért új eredmények összefoglalása.....</i>	<i>80</i>
<i>VIII. Irodalom.....</i>	<i>83</i>
<i>IX. Köszönetnyilvánítás.....</i>	<i>104</i>
<i>X. A disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk.....</i>	<i>105</i>

I. Rövidítések jegyzéke

AHH.....	Aryl Hydrocarbone Hydroxilase
APC.....	Adenomatous Polyposis Coli
CI.....	Confidence Interval
CYP.....	Cytochrome P450
ECL.....	Enhanced Chemiluminescent Labeling
FAP.....	Familial Adenomatous Polyposis
GST.....	Glutathione-S-transferase
HNPCC.....	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HPV.....	Human Papillomavirus
MASA.....	Mutant Allele Specific Amplification
NAT.....	N-acetyltransferase
OR.....	Odds Ratio
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
RFLP.....	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCE.....	Sister Chromatide Exchange
SCGE.....	Single Cell Gel Electrophoresis

II. Bevezetés

A **‘daganatok molekuláris epidemiológiája’** – kifejezést Perera és Weinstein alkalmazták először az 1980-as évek elején, és ezzel egy új tudományág alapjainak lerakását kezdték meg (1). A molekuláris epidemiológia kialakulását a molekuláris biológiai módszerek rohamos fejlődése tette lehetővé, melynek köszönhetően egyre újabb és pontosabb kép alakult ki az emberi szervezetben zajló folyamatok molekuláris mechanizmusairól, másrészt az addig ‘csúcstechnológiát’ jelentő metodikák nagyon gyorsan váltak egyre szélesebb körben – akár rutin diagnosztikai laboratóriumok szintjén is – hozzáférhetővé. A **molekuláris epidemiológia az epidemiológia egy részterülete**, definícióját úgy fogalmazhatjuk meg, mint **“molekuláris biológiai módszerek alkalmazását az epidemiológiában”**. Az epidemiológiának ez a területe mára polgárjogot nyert a tudományban, és rendkívül dinamikusan fejlődik, molekuláris epidemiológiával foglalkozó intézetek alakulnak, társaságok jönnek létre, kifejezetten molekuláris epidemiológiai kongresszusokat tartanak.

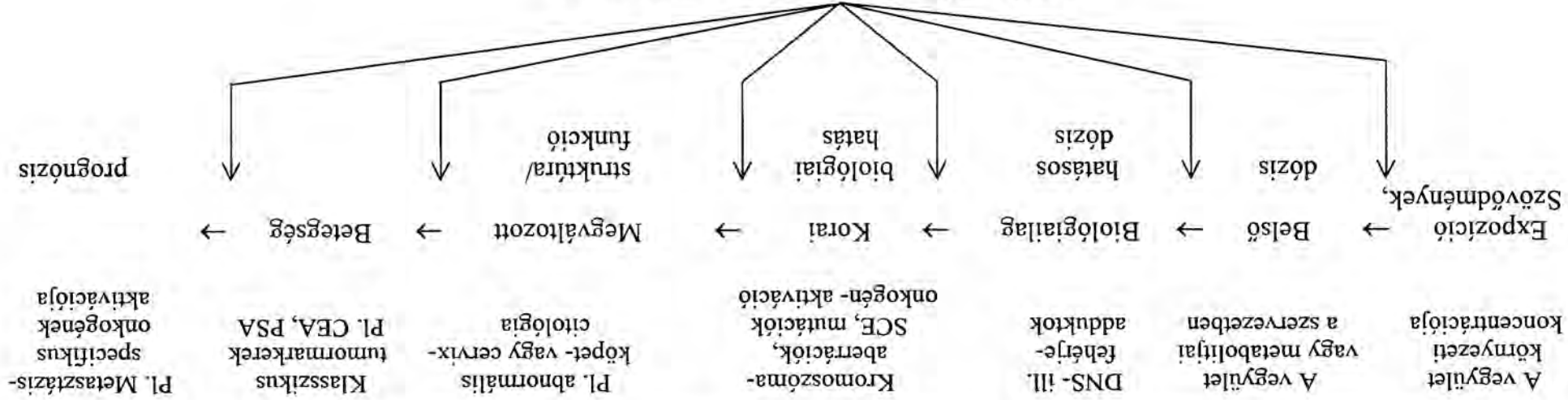
A hagyományos és a molekuláris epidemiológia közötti különbséget mutatja az 1. ábra, és egyúttal rávilágít arra is, hogy a **molekuláris epidemiológia koncepciójának szerves részét képezik a molekuláris szintű biomarkerek**. A tradicionális epidemiológia gyakran nem ismeri az expozíció és a betegség kialakulása közötti történéseket, a molekuláris biológiai módszerek alkalmazása viszont pontosan ezek feltárását tette lehetővé. A molekuláris epidemiológia csoportosítja, fázisokra osztja ezt a folyamatot, amelyekhez molekuláris biomarkereket rendel. Ezen markerek segítségével pontosan – és folyamatában – leírható az oki tényezők és az általuk okozott betegségek közötti kapcsolat, a legkorábbi stádiumtól kezdve egészen a betegséget követő szövődmények kialakulásáig. A molekuláris epidemiológia

HAGYOMÁNYOS EPIDEMIOLOGIA

EXPOZÍCIÓ → [] → BETEGSÉG

MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLOGIA

AZ EXPOZÍCIÓ MARKEREI A HATÁS MARKEREI A BETEGSÉGET JELEZŐ MARKEREK



EGYÉNI ERZEKENYSÉG MARKEREI

GENETIKUS/METABOLIKUS (P450, GST), DNS-REPAIR, TÁPLÁLTÁGI-, IMMUNOLÓGIAI STÁTUSZ

1. Ábra. A hagyományos és a molekuláris epidemiológia összehasonlítása (Schulte után)

fontos feladata, hogy új biomarkereket találjon, vizsgálja alkalmazhatóságukat, és a gyakorlat – elsősorban a prevenció – számára hasznosítható módszereket fejlesszen ki, amelyek lehetővé teszik az expozíció → betegség folyamat eddiginél pontosabb nyomon követését.

A molekuláris epidemiológiai módszerek egy része napjainkra már a kuratív és a preventív orvosi munka során is felhasználható **gyakorlati eredményeket szolgáltatott** (2). A molekuláris biomarkerek alkalmazása segítséget nyújthat az egészségügy számára a krónikus nem fertőző betegségek – így a rosszindulatú daganatok –prevenciójától kezdve a korai diagnózison át egészen a terápia megválasztásáig, a szövődmények megelőzéséig.

A korai biomarkerek lehetővé teszik az expozíció pontos mérését, az exponáltak körének meghatározását, és ennek alapján az expozíció csökkentésére tehetünk intézkedéseket, vagy az érintetteket ki lehet emelni az exponált környezetből. A molekuláris epidemiológia segítségével sikerült például rendkívül komplex foglalkozási eredetű karcinogén-expozíciók korai hatását pontosan megmérni, hozzájárulva ezzel a pontos kockázatbecsléshez (3). A munka- és foglalkozás-egészségügy számára nyújtott adatok azért is nagyon lényegesek, mert sajnos még ma is számos olyan munkakört, illetve foglalkozási eredetű expozíciót ismerünk, amely fokozott daganatos kockázattal jár együtt (4).

A foglalkozási eredetű karcinogén-expozíciókkal szemben – ahol kevesebb ember van kitéve viszonylag magas expozíciónak – a környezet-egészségügy jelentőségét legfőképpen az adja, hogy a környezeti expozíció nagy populációkat érint. Komoly problémája viszont, hogy általában alacsony expozíciókat kell vizsgálnia, amelyeket nehéz pontosan megmérni, és a sok zavaró tényező jelenlétében hatásukat azonosítani, kvantifikálni (5). Válaszul a kihívásokra, **a molekuláris epidemiológia a környezet-egészségügyi gyakorlatban felhasználható mérési és epidemiológiai módszereket fejlesztett ki**, az alacsony expozíciókkal kapcsolatos rizikóbecsléshez, prevencióhoz (6).

A molekuláris epidemiológiai módszerek jelen vannak az expozíció → betegség folyamat másik végének – a szövődmények kialakulásának – vizsgálatában is. A klinikumban ma már sok helyen rutinszerűen alkalmazott

prognosztikus markerek jelentős része molekuláris epidemiológiai vizsgálatok eredményeként vált a gyakorlatban felhasználhatóvá. Első lépésben molekuláris epidemiológiai vizsgálatokkal igazolni kell az adott biomarker prognosztikus szerepét, ami ezután kerülhet át a mindennapok gyakorlatába. A **daganatok prognózisával kapcsolatban** – a hagyományosan alkalmazott módszerek, pl. szövettani vizsgálat mellett – **számos ilyen molekuláris biológiai markert ismerünk: génamplifikációk (7), gén-overexpressziók (8), onkogének és tumor szuppresszor gének pontmutációi (9).**

A molekuláris epidemiológiában vizsgált biomarkerek között olyanok is vannak, amelyek nem elsősorban az expozíció → betegség folyamat valamelyik stádiumára jellemzőek, hanem **a kezdeti és a végpont közötti kockázati viszony leírására alkalmasak. Ezek a markerek az egyéni érzékenység biomarkerei, vagyis mindazok a tényezők, amelyek befolyásolják az expozíciótól a betegségig haladó folyamatot, annak bármely stádiumára hatást kifejtve. Mindezek a tényezők okozzák a daganatok iránti egyéni érzékenységben tapasztalt genetikai különbségeket, és – természetesen a véletlen szerepét sem mellőzve – felelősek azért, hogy **ugyanolyan környezeti expozíciónak kitett populációban csak bizonyos személyek lesznek betegek, mások pedig egészségesek maradnak.** Ezen tényezők vizsgálata nélkülözhetetlen a pontos kockázatbecsléshez, a karcinogén vegyületek humán hatásainak vizsgálatához, preventív stratégiák kidolgozásához. Míg korábban főként az örökletes daganatokat, daganatos syndromákat okozó géneket ismerték, ma – a molekuláris epidemiológia fejlődésének köszönhetően – számos, „gyengébb hatású” genetikai tényezőt is ismerünk, amelyek azonban egymással vagy környezeti tényezőkkel való kölcsönhatásban mégis lényegesen emelkedett kockázatot eredményezhetnek (10). **A molekuláris prediktív epidemiológia** e tényezők segítségével a minél pontosabb **csoport- majd egyéni szintű kockázatbecslés** elméleti és gyakorlati lehetőségeivel foglalkozik.**

Intézetünkben 1992 óta folyunk molekuláris epidemiológiai kutatások, elsősorban a daganatokkal kapcsolatos biomarkerek terén. **PhD értekezésemmel kapcsolatos munkámat is a molekuláris epidemiológia területén végeztem, annak három elemével foglalkozva.** Arra törekedtem,

hogy a – gyakorlati hasznosítást szem előtt tartva – az expozíció → betegség folyamat több aspektusát is vizsgálhassam, a korai markerektől kezdve az egyéni érzékenységen át egészen a prognosztikus jellegű biomarkerek alkalmazásáig:

➤ A daganatokkal kapcsolatos biomarkerek kutatásának napjainkban talán a **legdinamikusabban fejlődő területe a daganatok iránti egyéni érzékenység biomarkereinek vizsgálata** (2). Tudjuk, hogy nem csak az örökletes daganatok vezethetők vissza genetikai okokra, hanem a sporadikus tumorok kialakulásának kockázatát is befolyásolják különböző genetikai tényezők. Ilyen tényezők például a karcinogén vegyületeket metabolizáló enzimek génjeinek allélpolimorfizmusai. Az **egyéni érzékenységet befolyásoló tényezők kifejezhetik hatásukat az expozíciótól a betegség kialakulásáig vezető folyamat minden lépésénél**. Vizsgálatuk különösen fontos a prevenció szempontjából, elsősorban azért, hogy segítségükkel megtalálhassuk azokat a “high-risk” populációkat illetve személyeket, akik fokozottan veszélyeztetettek a daganatkialakulás szempontjából. **Újannon felismert gyakorlati jelentősége, valamint komplexitása miatt disszertációmban ez a terület szerepel a legnagyobb súllyal.**

➤ A **korai biológiai hatás markereinek tekinthetők a génexpresszió-változások**, amelyek karcinogén-expozíció hatására jönnek létre különböző szervekben, szövetekben. Ezeknek nagy előnye lehet a korai hatás hagyományos markereivel (SCE, kromoszóma-aberrációk, pontmutációk) szemben, hogy finomabb, kisebb változásokról lévén szó, **alacsonyabb expozíciók vizsgálatára is alkalmazhatók, másrészt nem genotoxikus karcinogének hatását is képesek detektálni**. A génexpresszió-változásokkal kapcsolatos korábbi aspektusokon túl, amelyek főként *in vitro* vizsgálatokban, vagy már kialakult daganatokban tanulmányozták az onkogének és tumor szuppresszor gének expresszió-változásait, intézetünkben a **karcinogén-expozíció hatására bekövetkező *in vivo* génexpresszió-változások vizsgálatát** kezdtük el.

➤ Számos biomarkert ismerünk, amelyek a betegség prognózisáról szolgáltatnak információt. Minden ilyen adat nagy segítséget jelenthet a klinikus számára, az adekvát terápiát megválasztásához. Ilyen **prognosztikus markerek lehetnek például egyes onkogén-amplifikációk**. A DOTE Pathológiai Intézetével együttműködve, humán tumorok elemzésével kapcsolatot próbáltunk keresni egyes onkogének amplifikációja és a daganat biológiai tulajdonságai ill. a betegség prognózisa között.

A PhD disszertációmban összefoglalt molekuláris epidemiológiai vizsgálatoknak végső soron az a – közelebbi vagy távolabbi – célja, hogy a rutin laboratóriumok, illetve a gyakorló orvosok számára is használható módszereket fejlesszen ki, amelyek szerepet kaphatnak a daganatok megelőzésében, vagy a közvetlen gyógyító munkában. A daganatepidemiológia terén ma már nem lehet mellőzni az új, molekuláris szintű biomarkereket, így az egyéni érzékenység markereit sem, vagyis a molekuláris prediktív epidemiológiai vizsgálatok jelentősége a jövőben ugrásszerűen növekedni fog.

III. Háttér, előzmények

III.1. A daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálata

III.1.1. Genetikai és környezeti tényezők a daganatok kialakulásában

A betegségek kialakulásáért felelős okokat két nagy csoportra oszthatjuk, **környezeti** (más megfogalmazás szerint külső) és **genetikai** (azaz belső) tényezőkre (2). Ez a felosztás teljes mértékben igaz a daganatokra is, sőt ezen betegcsoportnál gyakran különösen jól tanulmányozhatjuk a betegség kialakulásának környezeti és genetikai komponenseit. Mivel félreértésekre adhat okot, érdemes tisztázni, hogy a molekuláris epidemiológia e csoportosítása az életmódból (pl. dohányzás, táplálkozás) és a belső környezetből eredő tényezőket (pl. szekunder epesavak esetleges karcinogén hatása) környezeti hatásként nevezi.

A humán karcinogenezisben ritkák azok a szélsőséges esetek, amikor vagy csak a genetikai vagy csak a környezeti tényezők lennének kizárólagosak.

A külső tényezők kizárólagossága inkább állatkísérletben, kémiai karcinogénnel indukált daganatokkal modellezhető, bár a genetikai faktorok szerepe még ilyenkor is fontos lehet (11). Emberekben a karcinogenezisnek ez a formája – amikor egy bizonyos külső karcinogén expozíció hatására az érintett populáció gyakorlatilag minden tagjában kialakul a daganat – szinte sohasem fordul elő, mert a gyakorlatban az ehhez szükséges nagy karcinogén dózissal csak igen ritkán találkozunk. Ismeretesek viszont olyan daganatok, ahol a **környezeti tényezők dominanciáját** találjuk, erre jó példa a férfiak dohányzás-okozta tüdőrákja. Epidemiológiai adatok szerint a férfi tüdőrákok mintegy 80-90%-áért a dohányzás tehető felelőssé (12), vagyis itt elsősorban külső karcinogén-expozíció érvényesül. Ennek ellenére nem minden dohányzó

férfi lesz tüdőrákos, hanem csak kb. minden tizedik, ami arra utal, hogy a **dohányzás nem kizárólagos okként szerepel**, hanem rajta kívül még más környezeti és genetikai tényezők is szerepet játszanak a tüdőrák kialakulásában.

A másik szélsőséges eset a genetikai tényezők kizárólagossága, amit **örökletes daganatok**, illetve **daganatos szindrómák** (pl. Li-Fraumeni szindróma) kapcsán láthatunk. Ilyenkor a környezeti tényezők jelentősége gyakran igen csekély, pl. a retinoblasztoma örökletes formájánál, ahol az Rb tumor szuppresszor gén pontmutációjának öröklése esetén a betegség gyakorlatilag 100%-ban kialakul az érintettekben (13). Más örökletes daganatoknál a penetrancia alacsonyabb lehet, például a BRCA1 gén mutációját hordozókban az emlőrák kialakulásának valószínűsége 70 éves korig kb. 55-75% (14). **Az örökletes daganatok az emberi daganatok kialakulásáért összességében véve is csak viszonylag kis mértékben felelősek.** Jelenlegi ismereteink szerint – és ez valószínűleg nem változik lényegesen a jövőben sem, hiszen a daganatok örökletes jellege a családi halmozódás, illetve a családfák elemzésével jól diagnosztizálható – a daganatok nem több, mint 5-10 %-a tekinthető örökletes daganatnak (15).

Mivel a fent említett szélsőséges esetek meglehetősen ritkák, általánosságban elfogadhatjuk a humán karcinogenezissel kapcsolatos alaptételtként, hogy **a daganatok kialakulása környezeti és genetikai tényezők kölcsönhatásának következménye.** Ebben a kölcsönhatásban az **egyes tényezők erőssége különböző:** Vannak daganatok, amikor elsősorban külső, környezeti, expozíciót tartunk felelősnek a tumor kialakulásáért, máskor pedig a genetikai tényezők fontosabbak. **Az arányok néha daganattípusokra jellemzőek**, például az agytumrok többségénél valószínűleg elsősorban genetikai komponensek meghatározóak (16), míg például a már említett tüdőráknál pedig főként a dohányzás, azaz külső tényező. **Többnyire azonban arról van szó, hogy ugyanolyan típusú daganat létrejöttének hátterében a konkrét daganatos beteget vizsgálva más-más oki tényezők dominanciáját találjuk**, némelykor a genetikai, máskor a környezeti faktorokét –vagyis a daganatnak létezik örökletes és sporadikus formája.

Természetesen a **daganatmegelőzés gyakorlatában** is a fenti modellel kell alkalmaznunk. **A daganatkialakulás kockázatát fokozó környezeti**

tényezőket meg kell próbálnunk megváltoztatni, kiiktatni, hatásukat mérsékelni, míg a preventív faktorok kockázatsökkentő hatását a legteljesebb mértékben ki kell használni. Mivel a génmanipulációkkal kapcsolatosan még a tudomány fejlődésére van szükség, és számos biológiai, technikai, jogi és etikai kérdés tisztázása is nélkülözhetetlen, ezért az emberi génállomány megváltoztatására egyelőre nincs lehetőség. A jelen és a közeljövő célkitűzése a **genetikai tényezőkkel kapcsolatosan azok megismerése, és az így szerzett ismeretek – például kockázatbecslésben történő – gyakorlati hasznosítása lehet.**

III.1.2. „Domináns jellegű” és „egyéni érzékenység jellegű” gének

Ha az előbbiek értelmében megpróbáljuk megismerni, vizsgálni a daganatokkal kapcsolatos genetikai tényezők szerepét, két fő csoportot különíthetünk el.

Lehetséges, hogy **egy domináns gén felelős a betegség kialakulásáért, illetve az emelkedett kockázatért** (itt a domináns kifejezés nem a domináns-recesszív öröklésmenetre utal, hanem azt jelzi, hogy egy fő, a betegség kialakulásáért döntően felelős genetikai komponensről van szó, ami a konkrét öröklésmenetet tekintve öröklődhet akár domináns, akár recesszív módon) [a félreérthetőség miatt talán helyesebb lenne a “fő gén” vagy “fontos gén” kifejezések használata, mivel azonban az irodalomban mégis a “domináns gén” ilyen értelmű használata terjedt el, mi is ezt alkalmazzuk], **vagy pedig több, önmagában kevésbé erős hatású genetikai tényező**

	„DOMINÁNS GÉN”	„ÉRZÉKENYSÉG”
Gyakoriság	Ritka	Általános (>1%)
Vizsgálati lehetőség	Családi	Populációs
Betegség – gén viszonya	Kapcsolt	Asszociáció
Penetrancia	Magas	Alacsony
Absz. és rel. kockázat	Magas	Alacsony
Járulékos kockázat	Alacsony	Magas
Környezet szerepe	Mérsékelt	Kritikus

együttes hatásáról van szó (I. táblázat).

I. Táblázat. A „domináns gén” és az „egyéni érzékenység” jellegű genetikai hatások összehasonlítása (17).

Mint a táblázatból is láthatjuk, az egyénre nézve komolyabb következményekkel jár a domináns gén által okozott betegség, melynek a penetranciája nagy, az érintettek abszolút és relatív kockázata magas. Mivel azonban előfordulásuk nem túl gyakori, ezért populációs szinten mégis a másik csoport – az egyéni érzékenység jellegű genetikai hatások csoportja – lényegesebb. Számos olyan gén létezhet ugyanis, amelyeknek egy bizonyos betegség kockázatát csak kis mértékben fokozó alléliánsai vannak (egyéni érzékenység jellegű tényezők), ezek viszont jóval gyakoribbak, tehát az egész populáció járulékos kockázatát nagyobb mértékben befolyásolják (18).

A fentiekből következik, hogy – a domináns jellegű genetikai tényezőkkel ellentétben – az egyéni érzékenységet befolyásoló faktorok vizsgálatához a populációs szintű, epidemiológiai módszerek nélkülözhetetlenek. Az egyéni érzékenység változásaihoz vezető genetikai tényezőknek igen széles skáláját ismerjük, de legnagyobb csoportjukat a metabolizáló enzimek génjei képezik (18).

III.1.3. Metabolizáló enzimek szerepe a karcinogenezisben

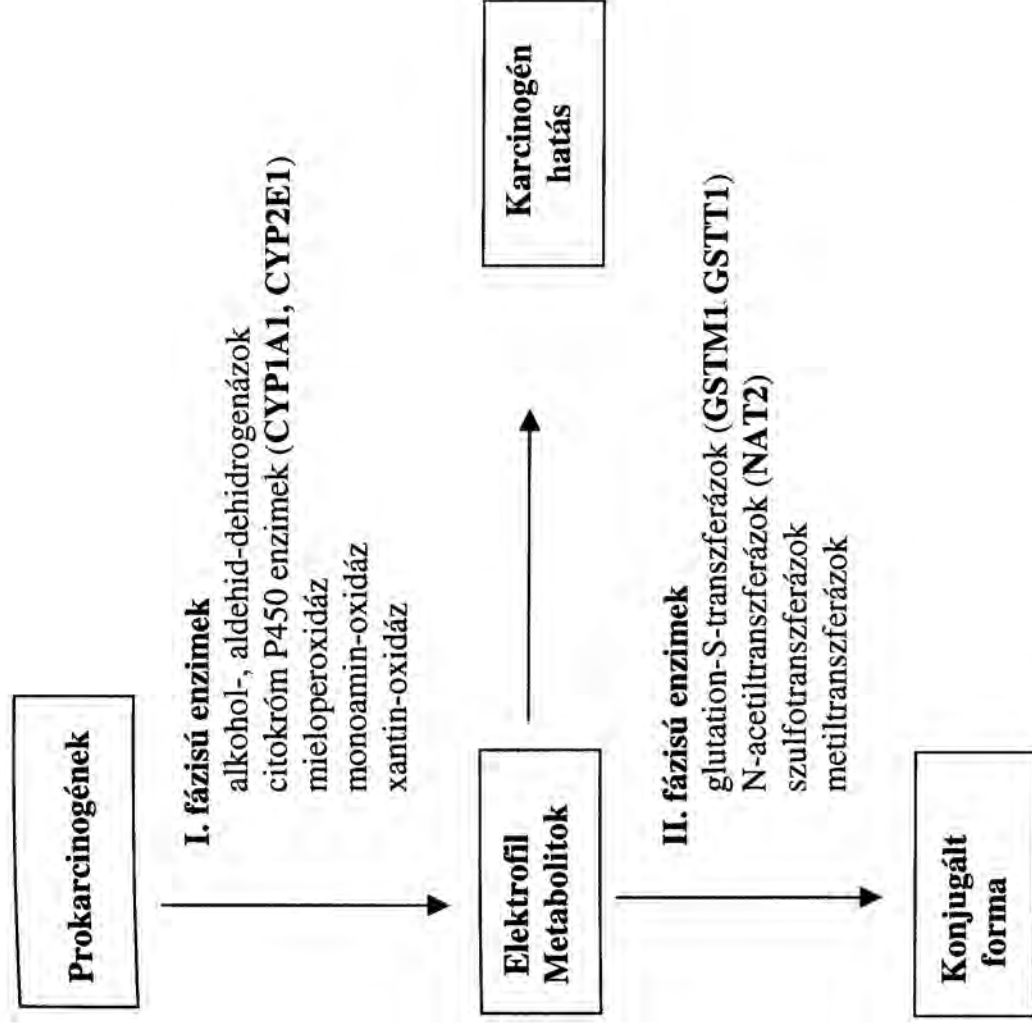
Környezetünkben a szervezetbe jutó vegyületek metabolikus átalakuláson mennek keresztül. Ez a karcinogén hatású vegyületekre is igaz, amelyek többsége úgynevezett prokarcinogén formájában kerül szervezetünkbe, azaz csak metabolikus átalakulás után válik definitív karcinogénné. Ezt, valamint a további átalakítást is az úgynevezett metabolizáló enzimjeink végzik. Mivel környezeti eredetű karcinogén-expozíció szinte minden daganattípus etiológiájában fellelhető (19), a metabolizáló enzimek működése számos humán daganat kialakulását befolyásolhatja.

A metabolikus folyamatok a karcinogenezis szempontjából két csoportba foglalhatók (2. ábra): Az úgynevezett I-es fázisú enzimek a szervezetbe került prokarcinogéneket elektrofil, reaktív metabolitokká alakítják (ezek a metabolitok felelősek a karcinogén hatásért), majd a II-es fázisú enzimek valamilyen konjugációs reakcióval a detoxikálást, kiválasztást segítik elő. E csoportosítás szerint tehát az I-es fázisú

metabolizáló enzimek a karcinogének aktiválásáért, míg a II-es fázisúak az inaktiválásért felelősek.

Már régóta ismeretes, hogy **metabolizáló enzimeink aktivitása** igen sok tényezőtől függ, és ráadásul **jelentős egyéni különbségeket mutat** (20). Ebből a tényből és abból, hogy ezen enzimek kulcsszerepet játszanak a karcinogén vegyületek metabolizmusában, logikusan következik, hogy befolyásolhatják a daganatok iránti egyéni érzékenységünket. Ha a **metabolizáló enzimek aktivitása egyéni variabilitást mutat**, akkor – ugyanolyan külső karcinogén-expozíció mellett – a **vizsgált személyek szervezetében aktuálisan jelenlevő karcinogén metabolitok koncentrációja különböző lesz**, ez viszont feltehetően **egyes daganatok kialakulásának kockázatát befolyásolja**.

Ezután rögtön fel kell tennünk a kérdést, hogy mi okozza a metabolizáló enzimek aktivitásának egyéni variabilitását. Sok tényezőt ismerünk, ami befolyásolja ezen enzimek aktivitását (II. táblázat), és láthatjuk, hogy a számos – ráadásul gyakran nehezen kategorizálható vagy standardizálható – befolyásoló tényező miatt az enzimaktivitások pontos, standard körülmények között történő mérése igen nehéz feladat.



2. Ábra. A karcinogén vegyületek metabolizmusának, valamint a főbb I-es és II-es fázisú metabolizáló enzimek funkciójának sémás ábrázolása, az általunk vizsgált enzimek feltüntetésével

- Életkor
- Nem
- Testtömeg
- Májfunkció
- Vesefunkció
- Terhesség
- Táplálkozás
- Dohányzás
- Alkoholfogyasztás
- Gyógyszeres kezelés
- Kölcsönhatás más enzimekkel
- Napszak, évszak
- Fáradtság - kipihenttség
- **GENOTÍPUS**

II. Táblázat. A metabolizáló enzimek aktivitását befolyásoló tényezők

Jelentőségét tekintve azonban – mint ezt a táblázatban is hangsúlyozzuk – egy tényező kiemelkedik a többi közül, a **genotípus**. **Metabolizáló enzimeink többsége ugyanis genetikailag polimorf, azaz többféle alléljük ismeretes (20).** A különböző allélek gyakran eltérő aktivitású enzimfehérjét kódolnak, illetve az enzimek indukálhatósága különbözhet (metabolizáló enzimeink nagyobbik része indukálható, amikor is az induktor jelenlétében expressziója jelentősen fokozódik). Vannak enzimek, melyeknek csak kevés alléljük van (pl. a különböző glutation-S-transzferáz enzimek), és vannak, amelyek számos alléllal rendelkeznek (pl. az N-acetiltranszferáz 2) (21). **Az enzimaktivitások egyéni variabilitása mögött álló legfontosabb tényező tehát a metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusa.** Végző soron tehát **ezen allépolimorfizmusok befolyásolhatják egyes daganatok iránti egyéni érzékenységünket.**

A daganatok iránti egyéni érzékenység és a metabolizáló enzimek kapcsolatának vizsgálata egyébként fenotípusos – vagyis az enzimaktivitás mérésén alapuló – vizsgálatokkal kezdődött (22). Ma már többnyire ismerjük az enzimaktivitások különbségeit okozó genetikai polimorfizmusokat, és ezért a vizsgálatok legnagyobb része genotípezáláson alapul.

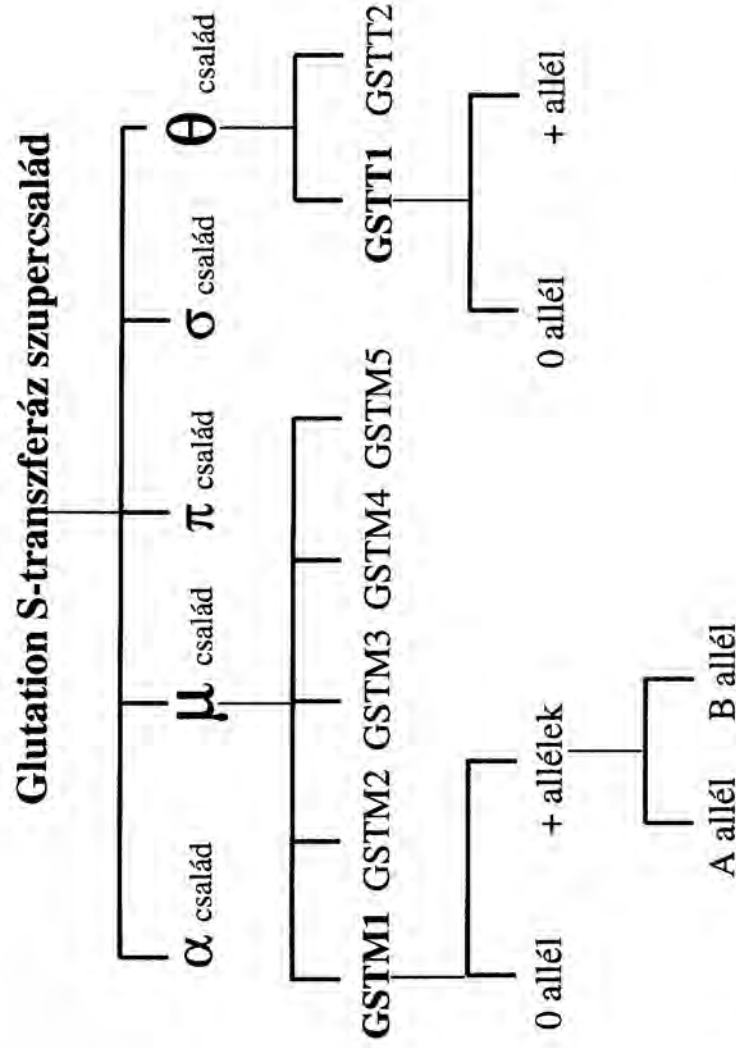
A daganatok iránti egyéni érzékenységgel kapcsolatos vizsgálatainkhoz a vastag- és végbéldaganatokat választottuk. Erről a későbbiekben részletesebben szólnunk, először azonban **áttekintjük azon főbb metabolizáló enzimeket, melyeket a colorectalis daganatok iránti egyéni érzékenységgel kapcsolatosan vizsgáltunk.**

III.1.4. A vizsgálatainkban szereplő, daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásoló főbb genetikai polimorfizmusok

III.1.4.1 Glutation-S-transzferázok

A glutation-S-transzferáz (GST) gén-szupercsalád II-es fázisú, detoxikáló enzimeket foglal magában, amelyek fontosságát jelzi, hogy a legtöbb – lehetséges, hogy az összes – ismert élő szervezetben, sejtben előfordulnak. Gerincesekben jelenlegi ismereteink szerint **öt géncsaládot különböztetünk meg (3. ábra), az α (a 6-os kromoszómán), a μ (az 1-es**

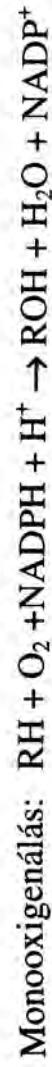
kromoszómán), a π (a 11-es kromoszómán) és a θ (a 22-es kromoszómán) géncsaládokat, valamint ötödikként a σ családot (az ide tartozó különböző fehérjéknek – mint például a szemlencse krisztallinja vagy a prosztaglandin D2 szintetáz enzim – nem elsősorban a glutation-S-transzferáz aktivitása a lényeges, hanem más biológiai funkcióik vannak).



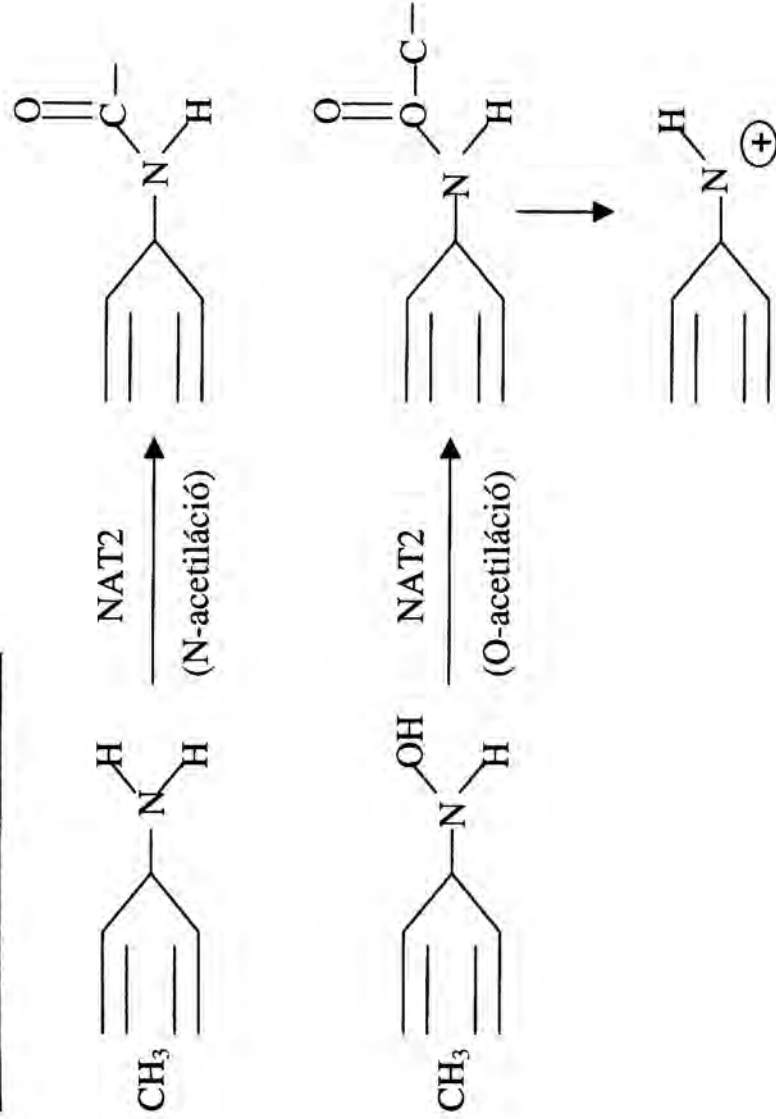
3. Ábra. A glutation-S-transzferáz gén-szupercsalád, a GSTM1 és GSTT1 enzimek polimorfizmusainak feltüntetésével.

A GST enzimek biokémiai funkciója a glutationnal való konjugáció, az eredeténél vízdékonyabb, a szerveztből könnyebben eltávolítható metabolitot eredményez (4. ábra). Mivel a redukált glutation kénatomja többfajta elektrofil csoporttal is képes reakcióba lépni, a GST-k szubsztrátja igen sokféle vegyület lehet, például oxidatív stressz által okozott reakciótermékek (23), vagy számos környezeti eredetű karcinogén anyag. Itt ki kell emelni a policiklikus aromás szénhidrogéneket, amelyek gyakran epoxid-csoportot tartalmazó metabolittá alakulnak az I-es fázisú enzimek hatására, és ezek az epoxidok a μ és a π enzimeknek jó szubsztrátjai (23). A GSTT1 enzim is számos karcinogén anyagot konjugál, metilázszereket, peszticideket, ipari oldószereket, például monohalometánokat és az etilénoxidot (23).

A CYP 2E1 enzim által katalizált főbb reakciók:



A NAT2 acetilációs reakciói:



Glutathionnal való konjugáció (GST enzimek):



4. Ábra. A CYP 2E1, a NAT2 és a GST enzimek fontosabb biokémiai reakciói

Jelenlegi ismereteink szerint a GSTM1 és GSTT1 (de lehet, hogy még további GST enzimek is) védenek az I-es fázisú enzimek által létrehozott karcinogén vegyületektől. Több *in vitro* vizsgálat bizonyította, hogy a funkcióképes GSTM1 és/vagy GSTT1 enzimet nem expresszáló sejtvonalak érzékenyebbek a mutagén-karcinogén anyagok hatásaira (pl. SCE gyakorisága), és a "háttér"-nek tekinthető genetikai károsodások aránya is magasabb ilyen sejtekben (24).

A GST α , π és σ géncsaládok enzimjeiről viszonylag keveset tudunk, valószínűleg nem játszanak lényeges szerepet a daganatok kialakulása iránti egyéni érzékenység meghatározásában, a GSTP1 enzim kivételével (25).

A **μ családnak** öt génje ismert (GSTM1–GSTM5), amelyek az 1p13 régióban helyezkednek el. **E család legismertebb tagja a GSTM1**, amely számos szövetben expresszálódik, például a májban, gyomorban, agyban (26). **A GSTM1 enzim genetikai polimorfizmusait tekintve a leglényegesebb az úgynevezett 0/+ polimorfizmus.** 0 allél a gént érintő deléció következményeképpen jön létre, a homozigóta 0 genotípusúaknak tehát nincsen funkcióképes GSTM1 enzimjük (+ allélnak a nem deletált, működőképes gént nevezzük). A homozigóta 0 genotípus előfordulása meglehetősen gyakori, európai és észak-amerikai fehér populációkban 40-60% körüli (27).

Meg kell említeni, hogy a GSTM1 gén alaposabb vizsgálata a + genotípusúakban két allélt mutatott ki, amelyeket A és B allélnak neveztek el (28, 29). Ezek egyetlen bázisban különböznek egymástól, a 7-es exon területén.

A GSTM1 enzim és a daganatok iránti érzékenység kapcsolatát – mint a többi metabolizáló enzim esetében is – főként eset-kontroll vizsgálatokban tanulmányozták. A szerzők legtöbbször abból a feltételezésből **indultak ki, hogy a homozigóta 0 genotípus – mivel a karcinogének detoxikálását elősegítő GSTM1 enzim az ilyen egyénekben nem funkcióképes – fokozottabb kockázatot jelentene egyes daganatok kialakulására nézve.**

Számos közlemény született a **tüdőrák** vonatkozásában, de ezek néha egymásnak ellentmondóak voltak (27-31). A közlemények többsége mégis igazolni látszott az alapfeltételezést, miszerint a **homozigóta GSTM1 0 genotípus kockázati tényező a tüdőrák kialakulása tekintetében.** A nem

teljesen egybehangzó eredmények oka feltehetően a különböző vizsgált populációkban a környezeti (pl. dohányzás) és genetikai eredetű (más metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai) zavaró tényezők egyenlőtlen megoszlása volt. A dohányzás és a GSTM1 polimorfizmus összefüggése elméletileg logikus, hiszen a tüdőrák vonatkozásában a cigarettafüstből származó karcinogének a GSTM1 enzim szubsztrátjai (32). **A dohányzás és a GSTM1 polimorfizmus között sikerült is a tüdőrák kialakulásának kockázatát fokozó kölcsönhatást kimutatni (33).**

Hólyagtumorokat vizsgálva a legtöbb szerző a tüdőrákhoz hasonló eredményeket kapott, azaz a GSTM1 0 allél fokozott érzékenységgel társult (34-36).

Sokan vizsgálták a **gyomor- bélrendszer daganatai** és a GSTM1 allélpolimorfizmusok kapcsolatát is (34, 37, 38). **Ezek a vizsgálatok már egyáltalán nem adtak egyértelmű eredményeket: Egy részük úgy találta, hogy a GSTM1 0 genotípus fokozza a vastag- és végbéldaganatok kockázatát (37), míg mások nem találtak ilyen összefüggést (38).** Ha a daganatok lokalizációját is tekintetbe vesszük, hasonló a helyzet. Zhong és mtsai például Edinburgh-ben és környékén végzett vizsgálatukban úgy találták, hogy a GSTM1 0 genotípus különösen gyakori a proximális tumorok esetében (34), míg Katoh és mtsai pedig distalis tumoroknál találták ugyanezt (39). A külső tényezőkkel való kölcsönhatások kapcsán a dohányzás vagy a húsfogyasztás (illetve egyes húsfogyasztási szokások, például a túl erősen megsütött húsok vagy a vörös húsok fogyasztása) és a 0 genotípus összefüggését próbálták tisztázni (40). Többnyire nem sikerült ilyen kölcsönhatásokat találni, illetve a különböző eredmények vagy ellentmondások, vagy nem összevethető, esetleg statisztikailag nem szignifikánsak (40, 41). Egy vizsgálat azonban figyelemre méltó, itt Lin és mtsai a brokkolifogyasztás protektív hatását vizsgálták colorectalis adenomák előfordulásával kapcsolatban, illetve ennek összefüggését a GSTM1 genotípusokkal (42). A brokkolifogyasztás szignifikánsan protektív faktornak bizonyult, de csak a GSTM1 0 genotípusú csoportban. Ez összhangban van ismereteinkkel, miszerint a brokkoli nagy mennyiségben tartalmaz izotiocianátokat, amelyek gátolják az I-es fázisú – karcinogéneket aktiváló – metabolizáló enzimeket, és indukálják a II-es fázisú – azaz detoxikáló – enzimeket (többek között a GSTM1-et is). Az izotiocianátok viszont egyúttal szubsztrátjai is a GSTM1-

nek, és a konjugált formájuk enzimindukció illetve gátlás szempontjából már inaktív. Ha tehát nincs jelen a GSTM1, akkor az izotiocianátok hosszabb időn keresztül kifejtetik gátló hatásukat az I-es fázisú enzimekre, valamint fokozhatják a többi II-es fázisú enzim expresszióját, és ezen folyamatokon keresztül csökkentik a karcinogén metabolitok koncentrációját a szervezetben. Ha viszont működik a GSTM1 enzim – a + genotípusúaknál –, akkor konjugálja, és így hatástalanítja az izotiocianátokat. Ez jól példázza, hogy egy **detoxifikáló enzimnek is lehet olyan hatása, ami bizonyos körülmények között a daganatkialakulás kockázatát fokozhatja.** Az eddig említetteken kívül még igen sokféle daganattal kapcsolatosan tanulmányozták a GSTM1 allélpolimorfizmusokat (**szájüregi daganatok, bőrrák, vesetumorok, leukémiák, emlőrák, stb.**), itt a szerzők egy része kockázati tényezőnek találta a 0 genotípust, míg a többiek nem találtak ilyen összefüggést (34, 43, 44).

A **θ család** két gént foglal magában (GSTT1, GSTT2), és az általuk kódolt enzimeket a májban sikerült kimutatni, illetve expresszálnak más szövetekben, például a gyomorban és a vastagbélben is (45). A GSTT1-nek a GSTM1-hez hasonlóan inzerciós/deléciós polimorfizmusa létezik, ahol a 0 genotípus európai populációkban a GSTM1 0 genotípusnál valamivel ritkábban fordul elő (kb. 10-20%) (38).

A **colorectalis daganatok** iránti érzékenységgel foglalkozó vizsgálatok közül többen nem találtak (39, 46) összefüggést a GSTT1 genotípussal, egy közlemény (31) azonban a 0 allélt hordozók statisztikailag szignifikánsan magasabb kockázatáról számolt be.

III.1.4.2. CYP1A1

A **CYP1A1 gén az I-es fázisú metabolizáló enzimek közé tartozik,** és a daganatok kialakulásának kockázatával szoros kapcsolatban van, hiszen terméke, az **aril-hidrokarbon-hidroxiláz (AHH) a policiklusos aromás szénhidrogének metabolizmusában játszik fontos szerepet** (47-49). Az aromás szénhidrogének átalakulásának leggyakrabban az első lépése a CYP1A1 által katalizált **hidroxiláció**, amely – esetleg további metabolikus átalakulás után – aktív, a DNS-hez kötődni képes karcinogénné teszi a szervezetbe prokarcinogén formájában bejutott vegyületeket. Az enzim

legismertebb szubsztrátja a **benzo[a]pirén**, amely előfordul a cigarettafüstben, kipufogógázban, és egyéb égési folyamatok melléktermékeként. A gén a 15-ös kromoszómán helyezkedik el, a 15q22-24 régióban (50), és számos allélvariánsa ismert. A CYP1A1 emberben elsősorban extrahepatikus szövetekben expresszálódik, ellentétben a legtöbb kísérleti állattal, ahol a májban is mérhető a CYP1A1-aktivitás. A CYP1A1 lényeges tulajdonsága, hogy **expressziója jelentős mértékben indukálható**, és induktorai között szerepelnek a szubsztrátjai, például a benzo[a]pirén vagy a 3-metilkolantrén.

A CYP1A1 **genetikai polimorfizmusai** közül 3-at ismerünk legpontosabban. Egy *MspI* RFLP, a 3' nem kódoló régióban (51), egy A-G polimorfizmus a 7-es exon területén, amely a fehérjében *Ile/Val* polimorfizmust eredményez (51), és egy további *MspI* RFLP, amelyet azonban csak afrikai és amerikai négekben sikerült kimutatni, fehér vagy ázsiai populációkban nem (52). Az *MspI* és az *Ile/Val* polimorfizmus kapcsolatát több populációban is vizsgálták, és egybehangzóan úgy találták, hogy egymással szorosan kapcsolatos öröklődnek (53, 54). Az *MspI* polimorfizmusnál a genotípusokat A, B, és C-nek nevezték el, A a gyakrabban előforduló homozigótákat, B a heterozigótákat, és C pedig a ritka homozigótákat jelöli. Az *Ile/Val* polimorfizmusnál az alléleket a kódolt aminosavak után *Ile* illetve *Val* alléleknek nevezzük. Ázsiai, elsősorban japán populációkban a ritkább allél előfordulási gyakorisága 30-40% körüli, míg Európában kb. 10% (55, 56).

Mivel a CYP1A1 számos policiklusos aromás szénhidrogént metabolizál, polimorfizmusainak a daganatok iránti egyéni érzékenységre kifejtett hatását legjobban a **tüdőrakkal** kapcsolatosan vizsgálták. **Japán vizsgálatok szerint mind az *MspI*, mind az *Ile/Val* polimorfizmus összefüggésben van a dohányzás-okozta laphámrákok kialakulásával, mégpedig a ritkább allélek jelentenek fokozott kockázatot (51). Más populációkon (norvég, finn, amerikai néger, német) végzett vizsgálatok érdekes módon általában nem találtak ilyen összefüggést (54, 56). A különbség legvalószínűbb magyarázata az eltérő allélmegoszlásokban rejlik: Míg Japánban a ritka homozigóták aránya kb. 10/100, addig ez Európában 1/100 körüli, ezért a fehér populációkon végzett vizsgálatok az alacsony előfordulási arány miatt legtöbbször nem is tudják külön vizsgálni a ritka homozigótákat. A ritkább allélek kockázatnövelő hatása valószínűleg azzal**

magyarázható, hogy az *MspI* C genotípusú személyekben a CYP1A1 jobban indukálható, mint a B, illetve A genotípusúakban, illetve a *Val* allél által kódolt enzim AHH aktivitása nagyobb, mint az *Ile*-enzimé. Ez – megfelelő mennyiségű szubsztrát jelenléte esetén – a bekerült karcinogének gyorsabb, fokozottabb metabolikus aktivációját eredményezi és így hozzájárul a tüdőrák kockázatának emeléséhez.

A **szájüregi daganatokkal** foglalkozó japán vizsgálatok többnyire egyértelmű kockázati tényezőnek találták a ritkább alléleket (57), bár nem minden esetben (58). Fehér populációkban pedig, ugyancsak a tüdőráknál kapott eredményekhez hasonlóan, a fenti összefüggést általában nem sikerült igazolni (59).

Mivel a CYP1A1 enzim a steroid hormonok metabolizációjában is részt vesz, felmerült a kérdés, hogy polimorfizmusa nem befolyásolja-e az **emlőrák** kialakulásának kockázatát. Több ázsiai populáción végzett vizsgálat talált ilyen hatást (60), de fehér és néger populációkban nem volt szignifikáns különbség az emlőrák kockázatát illetően a különböző CYP1A1 alléleket hordozók között (61).

Vastagbél-daganatokkal viszonylag kevesen foglalkoztak, az eredmények az imént tárgyalt daganatokhoz (tüdő- emlő- és szájüregi tumorok) hasonlóak (62).

Az eddig említetteken kívül néhány közlemény **más daganatokkal** (pl. gyomor- és pancreastumorok) kapcsolatos eredményekről is beszámol (63), de ezekben az esetekben biztosat nem mondhatunk, az ismételt vizsgálatok és konzekvens eredmények hiányában.

III.1.4.3. CYP2E1

Az **I-es fázisú metabolizáló enzimek közé tartozó CYP2E1 enzim** génje a 10-es kromoszómán helyezkedik el, 9 exont tartalmaz (64). Az enzim jelenlétét sok szervben kimutatták: máj, tüdő, bél, nyelőcső, vese, hasnyálmirigy, stb. (65). Többféle reakciót katalizálhat (4. ábra), a legjelentősebb a **monooxigenálás**, amikor is az eredeti szubsztrát hidrofílebb, gyakran reaktív metabolitja keletkezik. **Reduktív metabolizmusban** is részt vehet, ennek eredményeképpen a szubsztrát elektronfelvétellel és valamely csoportjának leadásával **szabadgyökké** alakul. Sokféle lehetséges szubsztrátja

van, amelyek többsége egyúttal induktora is az enzimnek. A legfontosabb, CYP2E1 által metabolizált vegyületek az **etilalkohol, acetone, benzol, anilin, kloroform, halotán, N-nitrozovegyületek, széntetraklorid, etilénlikol, sztirén**. Az enzimre elsősorban az alkohol általi indukálhatósága, illetve az alkohol metabolizmusában betöltött szerepe (acetaldehiddé történő konverzió) terelte a figyelmet, sokan tanulmányozták szerepét a májcirrhosis és más alkohollal összefüggő betegségek patomechanizmusában (66-68).

A génnek **számos polimorfizmusát** írták le, néhányat csak az utóbbi években. Ezek elsősorban az intronok területén helyezkednek el, ezért a fehérje aminosavsorrendjét nem érintik, biológiai jelentőségüket nem ismerjük. A leggyakrabban vizsgált ilyen polimorfizmus a 6-os intron területén található *DraI* RFLP, amely egy T-A transzverzió eredménye (69). A ritkább allél (elnevezések: C a ritkább, és D a gyakoribb allél) fehér valamint néger populációkban kb. 1%-os gyakorisággal fordul elő (70), míg ázsiai populációkban kb. 25-30%-ban (71, 72). Ezen kívül még *RsaI*, *MspI* és *TaqI* RFLP-t írtak le a CYP2E1 intronjainak területén (73-75). További polimorfizmusokat találtak az 5' nem kódoló régióban: Az itt levő *PstI* és *RsaI* polimorfizmus gyakorlatilag teljesen kapcsoltan öröklődik egymással (69, 73). Az *RsaI* ill *PstI* RFLP-vel kapott alléleket c1 és c2 alléleknek nevezzük, a c2 a ritkább allél. Az allélmegoszlás tekintetében a *DraI* polimorfizmushoz hasonló képet láthatunk, sőt a c2 allél előfordulási gyakorisága mind fehér és amerikai fekete (1-5%), mind ázsiai (19-28%) populációkban alacsonyabb, mint a *DraI* D allél (76, 77). Az 5' régióban levő polimorfizmusok biológiai jelentőségét is sikerült megtalálni: A HNF-1 (hepatic nuclear factor) transzkripció faktor kötődésének befolyásolása által megváltoztatják a gén expresszióját, indukálhatóságát (78).

A daganatok iránti egyéni érzékenység tekintetében meglehetősen ellentmondásosak az eredmények. Az alkoholfogyasztással kapcsolatba hozható daganatok közül a **szájüregi daganatokra** vonatkozóan negatív (58) és pozitív (79) eredmények is születtek. Az utóbbi vizsgálat taiwani populáció bételt nem rágó alcsoportjában találta úgy, hogy a c2 allél fokozza a szájüregi daganatok kialakulásának kockázatát. A **nyelőcsőrákra** (66) valamint a **nasopharyngealis carcinómára** (72) vonatkozóan is **találtak összefüggést**, míg a **vese- és a húgyhólyag** daganatai (80, 81) valamint a **hasnyálmirigy-tumorok** (63) **nem mutattak kapcsolatot a CYP2E1**

polimorfizmusokkal. Tüdőrák viszonylatában a kapcsolat összetett, a daganat szövettani típusától, a vizsgált polimorfizmustól és a dohányzástól függően különböző eredmények születtek (77, 82, 83), melyek alapján **valószínűnek tűnik a CYP2E1 kockázatot módosító hatása**, ám még további bizonyításra szorul.

III.1.4.4. NAT2

A gén a 8p22 régióban található, és az általa kódolt enzim, az **N-acetiltranszferáz 2 a II-es fázisú** metabolizáló enzimek közé tartozó detoxikáló enzim (84). A gén egyetlen exonból áll, és 290 aminosav hosszúságú fehérjét kódol. Emberben még egy N-acetiltranszferáz gén (a NAT1), valamint a NATP pszeudogén (a pszeudogének a funkcionális génekhez nagyon hasonló szekvenciák, amelyek azonban különféle genetikai változások miatt nem kódolnak működőképes fehérjét) ismeretesek (84). A NAT2 enzim a májban és a gyomor-bélrendszerben expresszálódik legerősebben, a NAT1 pedig sokféle extrahepatikus szövetben megtalálható. Az enzimek számos aromás amin metabolizmusában, illetve hidrazinszerkező vegyületek átalakításában vesznek részt (4. ábra) (84). Ezek az átalakulási folyamatok **N-acetiláció (aromás aminok, hidrazinok; detoxikáló jellegű reakció), és O-acetiláció (N-hidroxilezett aromás aminok, heterociklusos aminok; aktiváció)**. Annak ellenére tehát, hogy a II-es fázisú enzimeket általában **detoxikáló enzimeknek tekintjük**, a NAT enzimek az **O-acetiláción keresztül számos karcinogén aktivációját segíthetik elő**. Ezért a NAT hatásaira nézve különösen igaz, hogy **szerv- daganat- és szubsztátspecifikusan** kell vizsgálnunk azokat.

A NAT2 polimorfizmusa áll egyes gyógyszerek hatása iránti érzékenység már viszonylag régóta ismert, öröklődő különbségeinek (procainamid, sulfametazin, isonicid) hátterében (84). A vizsgált populációt rapid, közepes és lassú metabolizálókra osztották e tulajdonságuk alapján. Kezdetben isonicidet vagy sulfametazint használtak a NAT2 acetiláló kapacitás tesztelésére, de hamarosan áttértek a coffein alkalmazására (85). A fenotípusos vizsgálatok különböző népcsoportokban rendkívül eltérő megoszlást mutattak: A lassú acetilálók aránya 5-90% között változott különböző populációkban: Kanadai eszkimóknál 5%, japánokban 10-20%,

fehér populációkban 50-60%, és egy afrikai populációban elérte a 90%-ot (86). Mivel a NAT enzimek szubsztrájtjai között bizonyított és feltételezett daganatkeltő vegyületek – heterociklusos aminok, arilaminok – vannak, feltételezhető, hogy a NAT polimorfizmusok befolyásolhatják egyes daganatok kialakulásának kockázatát.

A fenotípusosan mutatott acetilálási sebesség polimorfizmusainak genetikai hátterét vizsgálva **7 polimorf helyet** találtak a génben (G191A, T341C, A434C, G590A, A803G, A845C és G857A), amelyek különböző kombinációi alapján eddig **26 genotípust** sikerült azonosítani. Valójában létezik még 4 további polimorf bázisszubsztitúció is, ezek azonban néma mutációk, azaz mindegyik allél ugyanazt az aminosavat kódolja, ezért ezeket a variánsokat nem vizsgálják. Vad típusú allélnak a NAT^{2*4} allélt nevezzük, bár számos populációban nem ez a leggyakoribb allél. Különböző népcsoportok jelentős eltérést mutatnak az egyes szubsztitúciók gyakoriságát illetően, és ez eredményezi a fenotípusosan már említett eltéréseket. A gyakorlatban a legtöbb tanulmány a 191, 341, 590 és 857-es helyeket vizsgálja, mivel az esetek legnagyobb részében ezek felelősek a csökkent NAT-funkcióért (a vad típusútól eltérő alléleket hordozó személyek lassú acetilálók). Többféle vizsgálati módszert dolgoztak ki a NAT polimorfizmusok azonosítására, a legelterjedtebben az oligonukleotid-ligáción alapuló (87), illetve a 3 vagy 4 enzimmel végzett RFLP vizsgálatot használják (88). Ezekkel a módszerekkel a **lassú acetilálók kb. 95%-át azonosítani lehet**, ami a legtöbb epidemiológiai vizsgálat számára kielégítő pontosságú. Igen kevés vizsgálat számol be az összes allélre kiterjedő genotipizálásról, részben a bonyolult, hosszadalmas metodika miatt (az összes polimorf helyet vizsgálni kellene), részben pedig azért, mert még nem pontosan ismerjük mindegyik allél tulajdonságait (tehát megállapíthatjuk, hogy milyen allélról van szó, de nem tudjuk hova sorolni) (87).

A **daganatok iránti érzékenységgel** kapcsolatban a NAT polimorfizmusok viszonylatában legelőször a **hólyagtumороkat** vizsgálták. Lower és mtsai 1979-ben fenotipizáláson alapuló vizsgálatukban úgy találták, hogy a **lassú acetilálóknak fokozottabb a kockázatuk a hólyagtumороk kialakulására** (89). A magyarázat valószínűleg abban rejlik, hogy a karcinogén aromás aminok metabolizmusában a NAT és citokróm P450 enzimek is részt vesznek, kompetitív módon. Ha az N-acetiláció lassú, akkor a

citokrom P450 enzimek által történő fokozottabb aktiváció magasabb aktív karcinogén koncentrációt eredményez. Az első eredményeket további vizsgálatok erősítették meg, ahol különösen erős összefüggést találtak a NAT2 polimorfizmusokkal karcinogén aromás aminokkal exponált személyek vizsgálatára során (90).

Igen sokan vizsgálták a NAT2 polimorfizmusok hatását a **vastag- és végbéldaganatok** iránti egyéni érzékenységre. Ehhez az alapot az szolgáltatja, hogy a **heterociklusos aminok, amelyek a NAT2 (és a NAT1) szubsztrátjai, fokozzák a colorectalis daganatok kialakulásának kockázatát**. Mivel ezen **vegyületek esetén elsősorban O-acetiláció történik, a NAT2 tehát aktiválja őket**, és így az alapfeltételezés szerint a rapid acetilálók lennének a fokozottabb kockázatiúak. A vizsgálatok egy része mégsem talált összefüggést az allélpolimorfizmusok és a daganatkialakulás kockázata között (91), mások viszont úgy találták, hogy – az elméleti elvárásoknak megfelelően – a rapid acetilálók kockázata csakugyan magasabb (92). **Úgy tűnik, hogy a NAT2 rapid metabolizálók vastagbéldaganatos kockázata valószínűleg nagyobb, mint a lassú acetilálóké, de ennek kimutathatósága az expozíció és a vizsgált populáció egyéb tulajdonságainak függvényében változik.**

A többi daganattípust illetően az eddigi eredmények nem egyértelműek. Ellentmondó eredmények születtek például az **emlőrák** (93-95), és **tüdőrák** vonatkozásában, különösen ha a dohányzás hatását is figyelembe vették (96, 97).

III.1.5. p53-polimorfizmusok

A daganatok kialakulásának kockázatát “**egyéni érzékenység**” jelleggel meghatározó tényezők nem csak metabolizáló enzimek polimorfizmusai lehetnek. Sok más genetikai tényező is okozhat kisebb-nagyobb különbségeket a daganatok kialakulásának kockázatában. A 17-es kromoszóma rövid karján levő **p53 tumor szuppresszor génről például tudjuk, hogy kulcsszerepe van a sejtciklusnak, illetve a sejt fontos életfolyamatainak (replikáció, DNS-repair, apoptózis) szabályozásában** (98). A sejtet érő DNS-károsító hatás következtében a p53 protein felhalmozódik, és G1 fázisban megállítja a sejtciklust, amit vagy a hibák kijavítása vagy apoptózis követ, megakadályozva ezáltal a potenciális karcinoma sejt proliferációját. Egyike

azon géneknek, amelyeknek mutációit nagyon sok daganatban megtalálták (99). Ilyenkor a mutáns *p53* protein funkciója károsodik, viszont féléletideje gyakran megnő (azaz a fehérje stabilabbá válik, ami megzavarja a posztranszlációs *p53* regulációt). A humán daganatokban talált *p53* mutációk nem egyenletesen oszlanak meg a génen, hanem néhány úgynevezett mutációs hot-spot területén gyakrabban fordulnak elő (99). A génnek nem csak szomatikus, hanem ivarsejtes mutációit is ismerjük, amelyek öröklődő daganatos szindrómákhoz (Li-Fraumeni syndroma) vezetnek.

A *p53* tumor szuppresszor gén azonban nem csak a fenti, viszonylag jól ismert, és igen széles körben tanulmányozott módon befolyásolhatja a daganatok kialakulását, hanem **“egyéni érzékenység” típusú hatást is kifejezhet: a *p53* génnek ismeretesek genetikai polimorfizmusai is (100).** E polimorfizmusok egy része intronok területére esik, tehát fehérjeszinten egyáltalán nem jelentkezik, de van olyan allélpolimorfizmus is, amely a kódolt aminosav megváltozásához vezet (100). Ez azonban feltehetően nem okozza a fehérje tulajdonságainak nagymérvű változását, és ezáltal a biológiai funkciókra sincsen olyan drámai hatással, mint a már említett pontmutációk. **Az allélpolimorfizmus a 72-es kodon területén található G-C báziscsere, amely a fehérjében *Arg/Pro* (CGC – *Arg*, CCC – *Pro*) formában jelentkezik.** A kétfajta *p53* protein tulajdonságait, illetve különbségeit nem ismerjük pontosan, de feltételezhető, hogy a transzaktivációs domén területén levő szubsztitúció (arginin – nagy poláros oldallánc, prolin – kis apoláros oldallánc) valamelyest megváltoztatja a fehérje viselkedését. Az allélek megoszlása érdekes földrajzi változékonyságot mutat: A *Pro* allél gyakorisága északról dél felé haladva növekszik. A Svédország északi részén élő lappok között a *Pro* allélgyakoriság kb 17%, majd dél felé haladva (finnek 24%, svédek 28%, kínaiak 38%, indiaiak 54%) egyre nő, és Nigériában eléri a 63%-ot (101).

A fentiek ismeretében természetes, hogy többen próbáltak kapcsolatot keresni a *p53 Arg/Pro* polimorfizmus és a daganatok előfordulásának gyakorisága között. Számos vizsgálat foglalkozott a **tüdőrák** és a *p53* allélpolimorfizmus összefüggésével, és többségükben úgy találták, hogy a ***Pro* allél fokozottabb kockázattal jár együtt**, bár különbség volt az ázsiai és a fehér populációkon végzett vizsgálatok között (102, 103).

Sok vitát váltott ki a **méhnyakrákkal** való összefüggés vizsgálata. Storey és mtsai (104) közölték, hogy az *Arg/Arg* homozigóták hétszer olyan érzékenyek a humán papillomavírus által okozott cervixdaganatok iránt, mint a heterozigóták. Epidemiológiai vizsgálatuk eredményeit több szerző próbálta reprodukálni, de nem találtak semmiféle kockázatemelkedést az *Arg* allélt hordozókban (105, 106). Valószínű tehát, hogy az *Arg/Pro* allélpolimorfizmus mégsincs kapcsolatban a cervixrák kockázatával, illetve semmiképpen sem olyan mértékben, ahogy azt először feltételezték.

Érdekes, hogy míg a *p53* tumor szuppresszor gén szomatikus mutációira általában igen nagy figyelmet fordítanak, és sok közlemény foglalkozik a mutációs spektrum elemzésével különböző daganatokban, addig a *p53* allélpolimorfizmusokról szóló tanulmányok száma elenyésző a metabolizáló enzimek genetikai polymorfizmusaival foglalkozók mellett. Ezt mutatja, hogy a többi daganattípussal való korrelációt alig tanulmányozták. Néhány közlemény foglalkozik az emlőrákkal (107), és egy-egy más daganattal (108, 109), de például annak ellenére, hogy Sjalander és mtsai szignifikáns összefüggést találtak több *p53* polymorfizmus (közöttük az *Arg/Pro* allélpolimorfizmus) és **vastagbélrák** kockázata között (110) senki sem próbálta megerősíteni vagy cáfolni eredményeiket.

A *p53* allélpolimorfizmusokkal kapcsolatban tehát hangsúlyozni kell a további molekuláris epidemiológiai vizsgálatok szükségességét.

III.1.6. A vastag- és végbéldaganatok molekuláris epidemiológiai sajátosságai

Fejlett országokban a colorectalis daganatok a vezető daganatos halálokok között vannak. A mortalitás fejlődő országokban alacsonyabb, de növekvő tendenciát mutat. Világviszonylatban az incidenciát tekintve férfiak között 3., míg nőknél második helyen álltak a vastag- és végbél daganatai (férfiaknál az összes daganat 9 %-a, míg nőknél 10 %-a volt colorectalis daganat). Mortalitást illetően mind férfiaknál (az össz-daganatos mortalitás 8 %-a), mind nőknél (az össz-daganatos mortalitás 10 %-a) a 4. helyet foglalták el (111). Magyarországon az utóbbi évtizedben a colorectalis daganatos mortalitás növekvő tendenciát mutatott mindkét nem esetében (111), és a legutóbbi hozzáférhető adatok szerint (112) ugyancsak mindkét nemnél a

második legfontosabb halálokot képezi: 1998-ban 2550 férfi és 2323 nő halt meg vastag- és végbélrákban Magyarországon. Az utóbbi csak 33 halálessettel kevesebb, mint a nőknél vezető halálokot képező emlőrák okozta halálozás. **A fenti mortalitási adatok alapján a közeljövőben nem várható a colorectalis daganatok hazai népegészségügyi jelentőségének csökkenése.**

A nemek szerinti különbségeket vizsgálva azt láthatjuk, hogy **férfiakban valamelyest magasabb a mortalitás, mint nőkben**, de ez nem olyan jelentős, mint például a tüdőrák, vagy akár a gyomorrák viszonylatában.

A vastag- és végbéldaganatok kockázati tényezői között egyaránt találunk környezeti és genetikai tényezőket (113). A külső tényezők többnyire a táplálkozással függenek össze: Fokozza a kockázatot a magas zsírbevitel, főként az állati eredetű zsírok fogyasztása, a húsfogyasztás (különösen az erősen átsütött, füstölt, grillezett húsok) és valamelyest az alkoholfogyasztás is. Protektív faktornak bizonyult a zöldség- gyümölcsfogyasztás, a magasabb kalciumbevitel, a jelentős élelmi rost-bevitel, egyes vitaminok és antioxidánsok, mikronutriensek, valamint az utóbbi időben derült ki, hogy számos növényi eredetű kémiai anyag is antikarcinogén hatású a vastagbélben (114). Felmerült a nem-steroid gyulladáscsökkentők protektív szerepe is, amely ígéretes kemoprevenziós lehetőségnek tűnik (115). Az egyszerűen telítetlen, illetve az n-3 sorozatú többszörösen telítetlen zsírsavak védő hatása is lehetséges, de az mindenesetre bizonyos, hogy semmiképpen sem emelik a kockázatot. A táplálkozási tényezőkön kívül még számos más külső hatás is érvényesülhet, például a dohányzás és az inaktív életmód, vagy egyes foglalkozási eredetű expozíciók rizikónövelő hatása, de ugyancsak nagyobb a colorectalis daganatok létrejöttének valószínűsége epehólyageltávolítás utáni állapotban és a vastagbelet is érintő krónikus gyulladással betegségeknel (113).

A colorectalis daganatok egy részére jellemző a családi halmozódás, illetve gyakran jól követhető öröklésmenet a családon belül. Az örökletes vastagbéldaganatok, illetve daganatos szindrómák alapvetően két csoportra oszthatók, aszerint, hogy polyposis talaján kialakuló daganatról beszélünk-e, vagy pedig a daganatos betegekre nem jellemző a vastagbélben levő nagy számú polypus jelenléte. Az utóbbi esetben a "hereditary non polyposis colorectal cancer" (HNPCC) áll fenn, amely még további alcsoportokra, szindrómákra bontható, aszerint, hogy csak a vastagbél (Lynch I), vagy más

szervek is érintettek (Lynch II). Az utóbbi években sikerült azonosítani a HNPCC kialakulásáért felelős gének csoportját, amelyek a DNS "mismatch repairben" részt vevő gének. Ezek közül kettőnek (hMSH2 és hMLH1) a pontmutációi gyakoribbak, míg a másik három gén (hMSH6, hPMS1, és hPMS2) ritkábban érintett. Mivel ezek a gének csak a HNPCC esetek kb. 70 %-áért felelősek (116), még további genetikai tényezők felfedezése, azonosítása várható. A polipokkal járó syndromák közül a familiaris adenomatous polyposis (FAP) a legismertebb és leggyakoribb, amelynek háttérében az APC (adenomatous polyposis coli) gén pontmutációit sikerült kimutatni. A FAP-nak léteznek különböző variánsai, amelyek kevesebb és/vagy másfajta (laposabb) polypusokkal, esetleg egyéb tumorokkal járnak együtt (Turcot- és Gardner syndroma), amelyeknél szintén az APC gén mutációja az oki tényező (a Turcot syndromás esetek egy részének kivételével). Ebbe a csoportba tartoznak még más, ritkán előforduló örökletes daganatos syndromák is (juvenilis polyposis, Peutz-Jeghers syndroma).

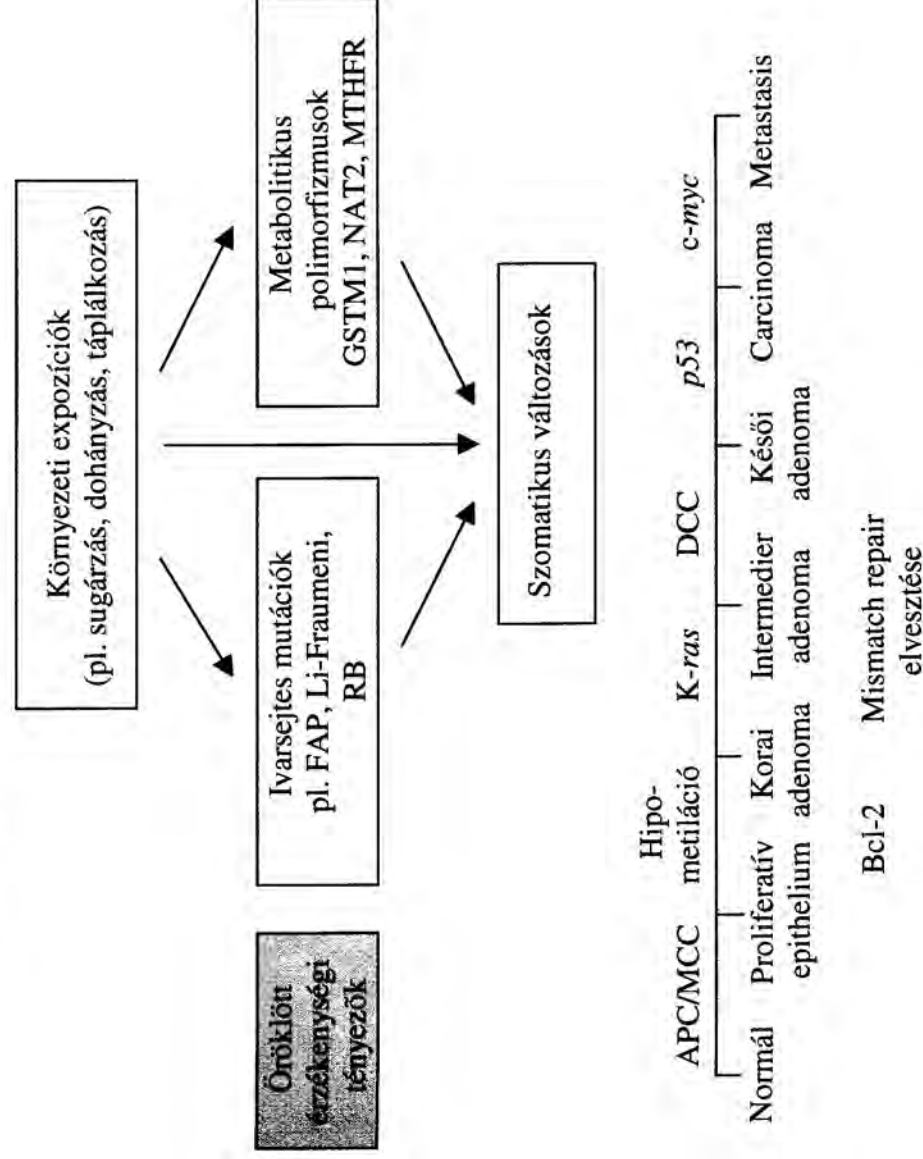
Az említett, ismert géneken kívül egészen biztosan léteznek még további genetikai tényezők, amelyek kisebb-nagyobb mértékben befolyásolják a colorectalis daganatok kockázatát. A már említett örökletes kórképeken kívül is a vastag- és végbéldaganatok további, nem jelentéktelen hányada ugyanis családi halmozódást mutat (különböző erősséggel), és ez valószínűleg genetikai okokra vezethető vissza. Ezeknek a familiáris halmozódáshoz vezető genetikai tényezőknek a többségét ma még nem ismerjük.

Régóta ismert a colorectalis daganatok kialakulásának szekvenciális modellje, amely az újabb ismeretek fényében egyre komplexebbé válik (5. ábra) (117). Az ábra is illusztrálja, hogy számos genetikai és környezeti tényező vehet részt végül is a daganat létrejöttében, legyen ez akár örökletes, akár sporadikus tumor.

Az eddigieket röviden összefoglalva azt mondhatjuk, hogy **a vastag- és végbéldaganatok etiológiája még nem teljesen tisztázott**. Ismerünk számos környezeti és genetikai tényezőt, amelyek részt vesznek a humán colorectalis karcinogenezisben, azonban **néhány területen – például a vastag- és végbéldaganatok iránti egyéni érzékenységgel kapcsolatban – még sok kérdés nyitva áll.**

A daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásoló allélpolimorfizmusok vizsgálatához munkám tárgyául azért választottam a vastag- és végbéldaganatokat, mert...

- ... a vezető daganatos halálok közé tartozó, népegészségügyi szempontból fontos daganatok.
- ... etiológiájuk teljesen még ma sem teljesen tisztázott, bár kialakulások molekuláris szintű mechanizmusáról már viszonylag sokat tudunk (szekvenciális modell)
- ... számos genetikai és környezeti tényező vesz részt kialakításukban, ami lehetőséget ad kölcsönhatásaik vizsgálatára.
- ... az eddigi adatok alapján feltehető, hogy egyes metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai befolyásolják kialakulásuk kockázatát.
- ... mortalitásuk hatékony primér és szekunder prevencióval jelentős mértékben csökkenthető lenne.



5. Ábra. A vastag- és végbéldaganatok kialakulásának modellje (Fearon és Vogelstein után)

III.2. Génexpresszió-változások, mint a korai biológiai hatás markerei

Régóta ismeretes, hogy egyes gének igen szoros kapcsolatban vannak a daganatok kialakulásával. Pontosan e szoros kapcsolat alapján kerültek közös csoportokba, és nevezzük őket **onkogéneknek** illetve **tumor szuppresszor géneknek** (118). Az ide tartozó gének biológiai funkciója különböző, közös viszont, hogy a **normális sejtműködés olyan elemeinek szabályozásában vesznek részt, amelyek zavara daganatsejt kialakulásához vezet**. Ezek a létfontosságú sejtfunkciók például a sejtciklus- és sejtosztódás szabályozása, intracelluláris jelátvitel, DNS-repair, az apoptózis szabályozása. Míg a tumor szuppresszor gének esetében a gén inaktivációja vezet a kóros hatáshoz, addig az onkogének csoportjában fordított a helyzet: A celluláris protoonkogének működése biztosítja a normális sejtfunkciókat, és aktivációjuk (amikor is onkogénnek nevezzük őket) vezet a hibás működéshez.

A **protoonkogének aktiválódása és a tumor szuppresszor gének inaktiválódása** többféleképpen is bekövetkezhet. Ezek a genetikai változások **lehetnek nagyobb, kromoszómákat, vagy kromoszómadarabokat érintő rendellenességek, de a leggyakoribbak mégis a génszintű változások**. A tumor szuppresszor gének inaktiválását okozhatja a gén egy részét vagy egészét érintő **deléció**. A legtöbb esetben inaktiváció – illetve a protoonkogének aktivációja – azonban **pontmutáció** következménye: A *p53* tumor szuppresszor gén pontmutációit az összes humán daganat kb. 50%-ában megtalálták (99), a *K-ras* onkogén mutációi is számos daganatban – így például a vastag- és végbéldaganatokban – gyakoriak (119). Az aktiváció további lehetősége a **génamplifikáció**, aminek következtében a kérdéses gén több kópiában – ez lehet csupán 2-3, de egyes esetekben akár száznál is több – lehet jelen a genomban, ami a transzkripciós szabályozástól függően általában mRNS szinten is megnyilvánul. Génexpresszió-változások természetesen létrejöhetnek génamplifikáció nélkül is, egyéb külső vagy belső mechanizmusok hatására (120). Génexpresszió-változást előidéző hatás lehet például az adott gén pontmutációja, aminek következtében a fehérje funkciója károsodik, és feed-back következtében a gén expressziója fokozódik. A

génexpresszió-változások során a gén kódoló régióban természetesen nincs a bázisrendet érintő változás – tehát a kódolt fehérje aminosavszerkezete sem változik –, viszont a gén transzkripciója fokozódik, tehát a mRNS és a fehérjetermék mennyisége növekszik. Az expresszió-változásokat egészséges sejtekben is megfigyelhetjük: A legtöbb onkogén és tumor szuppresszor gén expressziója a sejtproliferáció, a sejtciklus különböző fázisai, illetve a sejtek öregedése során nem állandó, hanem dinamikusan változik.

A molekuláris epidemiológia szerint a **korai génexpresszió-változások a korai biológiai hatás markereihez sorolhatók** (a kialakult daganatban mért overexpressziók pedig prognosztikus markerek). A korai biológiai hatás hatás markereinek értelmezése talán a legnehezebb feladat az expozíciótól a betegség kialakulásáig tartó folyamatban (1. ábra). A belső dózis és a biológiai hatásos dózis markerei az expozíció mértékére, és esetleg szerv- illetve szövetspecifikítására adnak felvilágosítást. A másik oldalon, a megváltozott struktúra vagy funkció markerei már a betegséget közvetlenül megelőző állapot kialakulására figyelmeztetnek (pl. abnormális cervix-citológia), és a további biomarkerek pedig (a klinikai betegség és a prognózis markerei) nyilvánvalóan a betegséghez kapcsolódnak. A korai biológiai hatás képezi tulajdonképpen az átmenetet a kétfajta (az expozíciót illetve a betegséget jelző) biomarkercsoport között, ezért nehéz megítélni jelentőségét a betegség kialakulására vonatkozóan. A génexpresszió-változások esetében pontosan ez a helyzet állt elő. A daganatkialakulás során a génexpresszió-változások (más genetikai eltérés nélkül) a promóció szakaszához kapcsolhatók. A promóció során sokáig nem történik irreverzibilis változás, ami pontosan megfelel annak, hogy az onkogének- és tumor szuppresszor gének expresszió-változásai is gyakran átmeneti jellegűek, valamilyen külső stimulus jelenlétéhez kötöttek, és annak megszűntével visszatér a kiindulási állapot. A korai génexpresszió-változások inkább az expozíció markereihez állnak közelebb, annál is inkább, mert állatkísérletes és *in vitro* eredmények szerint a karcinogén-kezelés hatására létrejövő emelkedett onkogén-expressziók rövidebb-hosszabb idő után visszatértek az eredeti szintre (121-124). Ha tehát a fentiek értelmében csupán az expozíció jellemzésére akarjuk használni az onko- és tumor szuppresszor gének expressziójának mérését, akkor is előnyük az expozíció egyéb markereivel szemben, hogy bizonyos mértékben mégis magukban foglalják a szervezet (illetve az adott szerv vagy

szervrendszer) érzékenységet, válaszreakcióit az expozícióra, vagyis azt a biológiailag releváns változásokhoz közelebb állva mérik. Éppen ezért veszélyeztetettség jelzésére az expozíció korai biomarkereiként jól alkalmazhatóak. Mindazonáltal elképzelhető, hogy a génextpresszió-változások a betegség kialakulásának közvetlen veszélyére figyelmeztető – azaz prognosztikus – markereként is használhatóak legyenek bizonyos esetekben, elsősorban akkor, ha ezek az expresszió-változások hosszú időn keresztül fennmaradnak (124).

Vizsgálatainkban a génextpresszió-változások biomarkerként való használhatóságát próbáltuk megítélni, először állatkísérletekben. Ezeket úgy állítottuk össze, hogy a kapott eredmények alapján megpróbálhassunk következtetéseket levonni a humán alkalmazhatóságról, majd a génextpresszió-vizsgálatokat humán epidemiológiai vizsgálatokban is alkalmaztuk.

A vizsgálatok során – néhány esettől eltekintve, ahol más onkogén-expressziókat is mértünk – a *c-myc*, *p53* és *H-ras* gének, illetve egyes kísérletekben az *N-ras* onkogén expresszióját vizsgáltuk. A következőkben röviden indokoljuk, hogy miért ezekre a génekre esett a választásunk.

A *c-myc* protoonkogén egy nukleáris onkoproteint kódol, amely transzkripciós faktorként működik, és egyike azon fehérjéknek, amelyek képesek a nyugalmi állapotban levő sejteket ismét a sejtciklusba vinni. A fehérje a Max proteinnel heterodimért képezve szekvencia-specifikusan a DNS-hez kötődik, és transzkripciós regulátorként DNS-szintézist indukálva transzformált sejt kialakulását is okozhatja (125). Daganatos sejtvonalakban, daganatokban nem ritka a *c-myc* overexpressziója (126-128), valamint erős transzkripciós aktivitást mutat még fokozott sejtproliferációval járó folyamatokban (122, 129).

A *p53* tumor szuppresszor gén is transzkripciós faktor, amely több igen fontos sejtfunkció szabályozásában vesz részt. Karcinogenezis szempontjából a legfontosabb, hogy képes a sejtciklus G1 fázisban történő blokkolására vagy apoptosisa viheti a sejtet (130). Ezt a folyamatot triggerelheti például DNS károsodás kialakulása (130), és a biológiai jelentősége nyilvánvaló: Nem engedi a hibás DNS-állományú sejteket tovább osztódni, szaporodni, megelőzve ezáltal az esetleges daganatkialakulást. A *p53* tumor szuppresszor gén inaktivációja tipikusan pontmutáció következtében történik, de gyakori a gént érintő deléción is, amit

informatív esetekben a heterozigotizás elvesztésével szokás detektálni. A *p53* reguláció igen lényeges eleme a posztranzlációs szabályozás, ami a protein aktiválódását, illetve stabilizálódását, majd később lebomlását eredményezheti – az utóbbi folyamatban fontos szerepe van az MDM2 proteinnek (131). Pontmutációk hatására is pontosan ezek a tulajdonságok változnak: A mutációk a termelődött *p53* protein funkcióját vagy stabilitását befolyásolják. Valószínűleg a posztranzlációs reguláció magyarázza, hogy a DNS, illetve RNS és a fehérjeszintű vizsgálatok eredményei gyakran nem pontosan egyeznek a *p53* daganatokban talált expressziójával, módosulásaival kapcsolatban (132). A posztranzlációs szabályozás fontos szerepe ellenére **mRNS szinten is számos vizsgálat talált *p53* expresszió-változásokat daganatsejtekben, vagy karcinogén vegyületekkel történő kezelés hatására (133-136).**

A *ras* géncsalád tagjai a sejten belüli jelátviteli kaszkád fontos elemei (137). A fehérjék a sejmembránhoz kötöttek, és GTP-áz aktivitást mutatnak. A jel továbbítása fehérjefoszforilációs kaszkádon keresztül történik. A *ras* által foszforilált fehérjék például a MAP-kinázok (mitogen activated protein kinase) vagy a raf fehérje. A *ras* géncsaládba tartozó protoonkogének (c-H-*ras*, c-N-*ras* és c-K-*ras*) valamelyikének **pontmutációját a humán tumorok kb. 30-50%-ában megtalálhatjuk (138).** A *ras* pontmutációk leggyakrabban bizonyos mutációs hot-spotokon találhatóak, ezek a 12-es 13-as és 61-es kodon. Ezek a mutációk megváltoztatják a *ras* protein GTP-kötő tulajdonságát, vagy GTP-áz aktivitását (138), ezáltal zavart okozva a jelátviteli mechanizmusban, folyamatos stimulusokat eredményezve kóros sejtproliferációhoz vezethetnek. A *ras* gének amplifikációját viszonylag ritkán (139-141), overexpresszióját viszont annál gyakrabban írták le daganatokban, daganatos sejtvonalakban, vagy karcinogén kezelés hatására (120, 123, 142-144).

III.3. Génamplifikációk, mint prognosztikus

markerek

Egyes gének amplifikációját gyakran megtaláljuk bizonyos daganatokban, például az emlőtumorokban nem ritka jelenség a *c-erbB-2*, az int-2 vagy a *c-myc* gén amplifikációja (145), a neuroblastomákban pedig az *N-myc*-génamplifikáció (146). A génamplifikációk jelenléte nyilvánvalóan a daganat lényeges genetikai jellemzője, különösen, ha az amplifikáció – mint az igen gyakran így is történik – fokozott mértékű RNS-szintézisben is megnyilvánul. A génamplifikációk – túl azon, hogy a daganat kialakulására vonatkozó információt adhatnak – gyakorlati jelentőséggel rendelkeznek: Olyan, jól vizsgálható biomarkerek, amelyek kapcsolatban lehetnek a daganat klinikopathológiai jellemzőivel, biológiai tulajdonságaival, és ezért **prognosztikus jelentőségük lehet. A génamplifikációk megléte általában kedvezőtlen prognosztikus jel.** A *c-myc* onkogén amplifikációja például a kedvezőtlen prognózis jele hepatocellularis carcinomában (147), az *erbB-2* amplifikáció az emlőtumorokban (148), valamint nagyon erős összefüggés van az *N-myc* amplifikáció megléte – illetve mértéke – és a neuroblastomák prognózisa között (146).

Mint az eddigiekből is kitudt, a ***c-myc* protoonkogén amplifikációja nem ritka különböző daganatokban.** Előfordul a gyomor-béltraktus daganataiban, például vastagbél-daganatokban (149, 150) és gyomorrákban (151, 152). A gyomorrákokkal kapcsolatos prognosztikus értékének vizsgálatáról többen beszámoltak, de az eredmények nem voltak teljesen egybehangzóak (152, 153).

IV. Célkitűzések

1. A **daganatok iránti egyéni érzékenység** vizsgálatával kapcsolatban metabolizáló enzimek (CYP2E1, CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2) allélpolimorfizmusainak és a **p53 tumor szuppresszor gén Ile/Val** polymorfizmusának a sporadikus vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Először arra a kérdésre kívántunk választ kapni, hogy a **magyar populációból származó egészséges mintákban milyen allélgyakoriságokkal találkozunk**. Ezeket a megoszlásokat össze akartuk hasonlítani irodalmi adatokkal, hogy megtudjuk, eltérnek-e lényegesen ezen allélmegoszlások más európai országokban találtaktól.
2. **Eset-kontroll vizsgálatokat** terveztünk az allélpolimorfizmusok colorectalis daganatos kockázatot befolyásoló hatásának vizsgálatára. **Az egészséges kontrollokban talált allélgyakoriságot összevetettük vastag- és végbéldaganatos betegek allélgyakoriságaival**, hogy tisztázzuk, mely allélek fordulnak elő gyakrabban a daganatos betegekben, mint az egészséges populációban.
3. Célul tűztük ki továbbá a metabolizáló enzimek között levő **gén-gén kölcsönhatások** vizsgálatát. Mivel az egyéni érzékenység jellegű tényezők általában csak kis kockázatkülönbséget okoznak, ezért az egyéni szintű kockázatbecslés irányába akkor haladhatunk, ha számos ilyen tényező hatását egyidejűleg figyelembe vesszük, illetve számolunk a közöttük levő kölcsönhatásokkal is. **Ezért a fenti polymorfizmusok tekintetében a több "high-risk" allélt hordozó személyek kockázatát elemeztük**.
4. A genetikai polymorfizmusok vizsgálatának új aspektusa a genotípus összevetése a daganat klinikopathologiai sajátosságaival, egyéb prognosztikus markerekkel. Ennek alapján már kialakult daganatoknál a **metabolizáló enzimek genotípusa új, önálló prognosztikus markerré válhat**. Vizsgálatunkban a prognózis ill. a daganat biológiai sajátosságainak markereként a **K-ras** pontmutációkat választottuk. Colorectalis daganatos betegek genotípusát (metabolizáló enzimek és p53 allélpolimorfizmusok) vetettük össze a tumor **K-ras** mutációs

státuszával, és vizsgáltuk, hogy egyes allélek hajlamosítanak-e a *K-ras* mutációval együttjáró vagy a *K-ras* mutáció nélküli tumorfejlődésre.

5. Mint a bevezetésben hangsúlyoztuk, az **egyéni érzékenység jellegű genetikai tényezők esetében igen fontos a környezeti tényezőkkel való kölcsönhatás**. Mivel vizsgálatainkat a colorectalis daganatokkal kapcsolatosan végeztük, így a colorectalis karcinogenezis egy elemét választottuk ki a **gén-környezet kölcsönhatás humán vizsgálatára**. A környezeti karcinogén-expozíció hatására a sejtekben DNS-károsodások jönnek létre, amelyek például lánctörések is lehetnek. A DNS-károsodások mértéke meghatározható a vastagbél nyálkahártyájáról lesodródott sejtekben, amelyeket székletből izolálhatunk. Ezekben a sejtekben vizsgáltuk a környezeti expozíció – esetünkben ez füstölt és sült húst bőségesen tartalmazó étrend volt – DNS-lánctöréseket okozó hatását. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ezt a környezeti hatást befolyásolja-e egyes metabolizáló enzimek (a GSTM1-et és a NAT2-t választottuk ki) genetikai polimorfizmusa. A **GSTM1 és NAT2 különböző alléljeit hordozó személyekben vetettük össze a táplálkozási eredetű expozíció következményeképpen létrejövő DNS-lánctörések mértékét, hogy megtudjuk, befolyásolja-e a genotípus a környezeti tényező DNS-károsító hatását.**

6. A korai biomarkerekkel kapcsolatos vizsgálatok célja az volt, hogy megállapítsuk, **alkalmasak-e az *in vivo* génexpresszió-változások karcinogén-expozíció detektálására**. Az *in vivo* génexpresszió-változások alkalmazhatóságát vizsgáltuk állatkísérletekben **genotoxikus hatású karcinogénnel (DMBA) történő kezelés hatására**. Azt kívántuk igazolni, hogy az ilyen expozíció hatására az egyes szervekben slot-blot hibridizációval detekálható onko/szuppresszor gén expresszió-változások jönnek létre.

7. Azt a hipotézisünket is bizonyítani próbáltuk, miszerint a génexpresszió-változások **nem genotoxikus hatású** vegyületekkel történő expozíció markereiként is szolgálhatnak. Ebben a kísérletben a

ciklosporin (mint nem genotoxikus, de humán tumorokat okozó anyag) hatására bekövetkező *in vivo* génextpresszió-változásokat mértük.

8. Hogy a gyakorlati felhasználás lehetőségét igazoljuk, a génextpresszió-változások **humán alkalmazhatóságát** is demonstrálni akartuk. **Etilén-oxidál exponált** kórházi dolgozókat vizsgáltunk, és a perifériás vérből izolált fehérvérsejtekben mért génextpressziókat hasonlítottuk össze nem exponált kontroll csoporttal, hogy megállapítsuk, detektálható-e kísérleti rendszerünkben az etilén-oxid expozíció hatása.

9. A génextpresszió-változások nem csak korai biomarkerként használhatók, hanem a **már kialakult daganatokban** is megtalálhatók, gyakran prognosztikus jelentőségük van. Mivel agytumorokra vonatkozóan a gén-overexpressziókról kevés adat állt rendelkezésre, célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy **milyen gének fokozott expressziója detektálható különböző agytumorokban**, megalapozva az overexpressziót mutató gének későbbi célzott vizsgálatát. Vizsgálni kívántuk továbbá a génextpressziók intratumorális heterogenitását is, ugyanazon daganat különböző helyeiről vett mintákból történő mérések segítségével.

10. A tumorok klinikai manifesztációjának stádiumában nagy jelentőségük van a molekuláris epidemiológia **prognosztikus biomarkereinek**. Mint az előzőekben utaltunk rá, a **c-myc gén amplifikációjának** feltehetően prognosztikus jelentősége van több daganattípus esetén, bár a kérdés még nem teljesen tisztázott. Éppen ezért célul tűztük ki a **c-myc-génamplifikáció vizsgálatát vastagbél- gyomor- és vesedaganatokban**, és az adatok összevetését a klinikopathologiai paraméterekkel, hogy a c-myc amplifikáció prognosztikus jelentőségét megítélhessük. Míg a c-myc gén esetében irodalmi adatok alapján valószínűnek tartottuk a prognosztikus jelentőséget, a másik vizsgálni kívánt gén, a **K-ras** amplifikációjára vonatkozóan csak igen kevés közlemény jelent meg. Ezért a **vesetumorok esetében a K-ras amplifikációk meglétét és prognosztikus szerepét is vizsgáltuk**.

V. Anyag és módszer

V.1. RNS-izolálás:

A géneexpressziós vizsgálatokhoz teljes celluláris RNS-t izoláltunk, egyrészt emberi vérből (15 ml vér, azonos térfogatú 0.84%-os NH_4Cl -dal történő centrifugálással vvt-mentesítve), másrészt állati szervekből, fenol-kloroform-izotiocianátos módszerrel (154).

V.2. DNS-izolálás PCR-hez (paraffinos blokkból, metszetből):

Nem tisztított DNS-t preparáltunk, hanem a metszetekről (illetve a blokkból) lekapart mintát xilollal történő deparaffinálás után 3 óráig $55\text{ }^\circ\text{C}$ -on $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ Proteinase K-val (SIGMA) emésztettük, majd 10 percig $95\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk, és $2\text{-}10\text{ }\mu\text{l}$ -t használtunk a PCR-hez (155).

V.3. DNS-izolálás (szövetmintából, tumorból):

A DNS izolálás standard fenol-kloroformos módszerrel történt (156).

V.4. DNS-izolálás (vérből):

Első lépésben 0.84% -os NH_4Cl oldattal való ismételt centrifugálással vvt-mentesítést végeztünk, majd a fehérvérsejtekből GenomicPrep (Pharmacia, Uppsala, Svédország) DNS-izoláló kittel, az ott leírt reagensekkel és protokoll alapján (Lízis – RNáz-emésztés – fehérjekicsapás – DNS feloldása) történt az izolálás.

V.5. Nukleinsavak blottolása, hibridizálás:

Blottoláskor 10 (egy- kísérleteknél 5) μg nukleinsavat vittünk Hybond N+ (Amersham) membránra, az Amersham ECL-kitben megadott protokoll szerint, Hofer slot-blotter segítségével, majd kemilumineszcensen jelölt (Amersham ECL) próbával $42\text{ }^\circ\text{C}$ -on éjszakán át hibridizáltuk. A membránokat kontrollként β -aktin génnel rehibridizáltuk. A keletkező kemilumineszcens jelet röntgenfilmen fogtuk fel, melyet előhívás után HP DeskScan IIC típusú szkennelvel számítógépbe vittük, és a denzitásokat Quantiscan 2.0 (Biosoft) programmal értékeltük. Az N-ras, H-ras, c-myc, p53,

c-sis, *c-myb*, *c-mos*, *c-fos*, *c-fos*, IL-2 receptor és β -aktin gének plazmidba illesztett klónozott génpróbáit (származás: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) intézetünkben *E. coli* HB 101 baktériumtörzsben szaporítottuk. A *c-ptc/ret* próbát prof. Ember István bocsátotta rendelkezésünkre (157).

V.6. Statisztikai módszerek:

A génextpresszió-változások mértékét, a Comet-assay-ben kapott tail-moment értékeket *t*-próbbával, a génextpresszió-változásokat mutató állapotok számát κ^2 -próbbával hasonlítottuk össze, SPSS PC+ statisztikai program segítségével. A génextpresszió-vizsgálatoknál az amplifikációk és a klinikai, szövettani paraméterek közötti kapcsolatot lineáris regresszió-számítással elemeztük (SPSS PC+). A prognosztikus markerek vizsgálatakor a Kaplan-Meier módszerrel számított túléléseket logrank-teszttel hasonlítottuk össze (SPSS PC+). A metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai és a vastagbél-daganatok iránti egyéni érzékenységgel kapcsolatos eset-kontroll vizsgálatoknál esélyhányados (OR) és 95% megbízhatósági tartományt számítottunk, az Epi Info 6.0 programmal (CDC, Atlanta). Az eset-kontroll vizsgálatok tervezését és értékelését Breslow és Day szerint végeztük. (158)

V.7. Kísérleti állatok, kezelési protokollok

Az DMBA hatásának vizsgálatához beltenyésztett Long-Evans patkányokat, a másik állatkísérletnél (ciklosporin) pedig, 6-8 hetes CBA/Ca egereket használtunk, csoportonként mindkét esetben 6 hím illetve 6 nőstény állatot. Az állatok vizet és standard LATI egér- illetve patkánytápot ad libitum fogyaszthattak.

A kezeléseket intraperitoneális injekció formájában történtek, 0.1 ml térfogatban. A kontroll egerek ugyanennyi fiziológiás NaCl oldatot kaptak. A DMBA kezelés dózisa 40 mg/ttkg, a ciklosporin-dózis pedig 80 mg/ttkg volt.

V.8. Allélpolimorfizmusok vizsgálata:

V.8.1. CYP1A1 (*Ile/Val* polimorfizmus):

A 7-es exonban levő *Ile/Val* polimorfizmust allélspecifikus polimeráz-láncreakció (PCR) segítségével vizsgáltuk (56). Ez két csőben párhuzamosan

zajlott, ahol ugyanaz volt az upstream primer, de a downstream primerek az utolsó bázisban különböztek egymástól.

PCR reakcióelegy: 20 µl össztérfogatban 5 µl templát DNS oldat (koncentrációjától függően 2-10 µl között változhat) 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 2 µg/ml bovin szérumalbumin, 4x0.2 mM dNTP, 0.5 U *Taq* DNS-polimeráz (PROMEGA), 1-1 µM primer. A reakció további paraméterei: 30 ciklus: 60 sec 94°C, 45 sec 59 °C, 90 sec 72 °C. (Techne Genius PCR-készülékben)

Ebben a reakcióban, és a továbbiakban is az esetek egy részében a PCR-t nem izolált DNS-templáttal, hanem közvetlenül 1 vagy 2 µl teljes vérből végeztük. Ekkor a reakciót 15 perces, 94 °C-on történő inkubálással kezdtük, és a reakcióelegyhez a *Taq* DNS-polimerázt ezután adtuk hozzá.

V.8.2. CYP2E1 (PstI polimorfizmus)

A genotipizálást PCR-RFLP segítségével végeztük (159). A PCR amplifikáció után keletkező DNS-szakaszt 2 U *PstI* restrikciós enzimmel (SIGMA) emésztettük és 2%-os agaróz gélben elektroforézis végeztünk. (6. ábra)

A PCR primerek CCAGTCGAGTCTACATTGTCA és TTCATTCTGTCTTCTAACTGG voltak. PCR reakció: 35 ciklus: 60 sec 94 °C, 60 sec 55 °C, 60 sec 72 °C

V.8.3. GSTM1 (homozigóta 0 genotípus)

A homozigóta deléció kimutatása kérdéses szakasz PCR amplifikációján alapulva, egyidejű belső kontroll jelenlétében (36).

Primerek: CTGCCCTACTTGATTGATGGG, CTGGATTGTAGCAGATCATGC
Kontroll primerek: GCAAACCACAATCGAATGCA, CTTTACTTCCTTTGCCCTCAG
PCR reakció: 30 ciklus: 45 sec 94 °C, 45 sec 59 °C, 80 sec 72 °C

V.8.4. GSTM1 – GSTT1 genotipizálás.

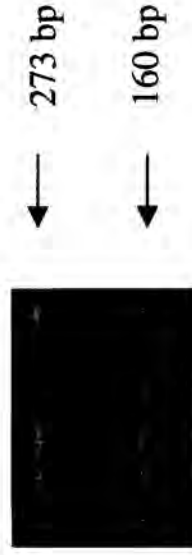
Azokban a kísérletekben alkalmaztuk, ahol GSTM1 és GSTT1 genotipizálás is történt. A reakcióelegyben mind a GSTM1, mind a GSTT1 specifikus primerek, valamint kontrollként a β-globin gén egy szakaszára specifikus primerek voltak jelen (6. ábra) (160).

Primerek: GSTM1-F: GAACTCCCTGAAAAAGCTAAAAGC
GSTM1-R: GTTGGCTCAAATATACGGTGG
GSTT1-F: TTCCTTACTGGTCTCACAATC
GSTT1-R: TCACCGGATCATGGCCAGCA
β-globin-F: CAACTTCATCCACGTTACCC
β-globin-R: GAAGAGCCAAAGGACAGGTAC

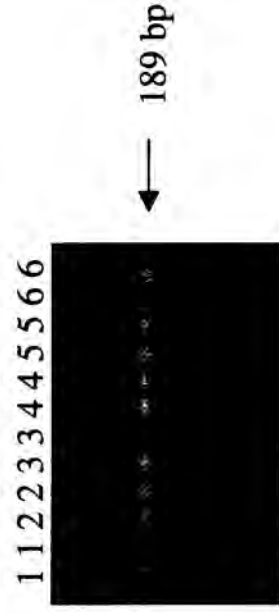
Reakcióelegy: 20 µl össztérfogatban 1,5 mM MgCl₂, 10 mM TRIS-HCl (pH=8.3), 2 µg/ml bovin szérum albumin, 4x0.25 mM dNTP, 2 U *Taq* DNS-polimeráz, 30-30 pmol GSTT1-F és GSTT1-R primer, 50-50 pmol GSTM1-F és GSTM1-R primer, 20-20 pmol β-globin-F és β-globin-R primer, 13 µl DNS-templát. PCR-reakció: 7 perc 94 °C, majd 35 ciklus: 60 sec 94 °C, 60 sec 60 °C, 60 sec 72 °C. Ezután 5 perc 72 °C.



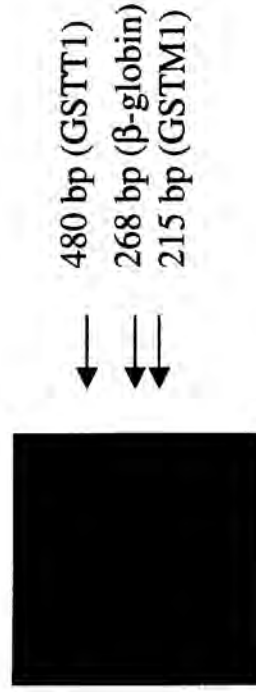
CYP 2E1 RFLP, *Pst*I enzimmel való emésztés után. A c1 allélnél nincs vágás, egy 410 bp fragmentumot kapunk (homozigóta c1: 1-es lane), c2 allél esetén 290 és 120 bp fragmentumok láthatók (homozigóta c2: 5-ös lane). Heterozigótáknál mindegyik fragmentumot megtaláljuk (4-es lane)



GSTM1 genotipizálás. A felső fragmentum megléte a GSTM1 + genotípust jelenti, míg hiánya homozigóta 0 genotípust azonosít. Az alsó band az egyidejűleg amplifikált kontroll fragmentum.



p53 allél-specifikus PCR. A páronkénti amplifikáció a bal oldali lane-eknél az *Arg*, a jobb oldali pedig a *Pro* allélre specifikus primerrel történt. (1-es személy genotípusa: homozigóta *Arg*, 2-es személy: heterozigóta, 6-os személy: homozigóta *Pro*)



GSTM1-T1 szimultán amplifikáció, kontrollként β -globin egyidejű amplifikációjával.

6. Ábra. A genotípusok meghatározása.

V.8.5. p53 (72-es kodon Arg/Pro polimorfizmus)

Allélspecifikus PCR segítségével, két csőben párhuzamosan, ugyanazzal a 3' primerrel, és az utolsó bázsiukban különböző 5' primerekkel (161) (6. ábra).

Primerek: 3' primer: GCAACTGACCGTGCAAGTCA
5' primerek: ATGCCAGAGGCTGCTCCCCG
ATGCCAGAGGCTGCTCCCC

Reakcióelegy: 20 µl össztérfogatban, mint a CYP1A1-nél., 13 µl DNS templát. PCR-reakció:
30 ciklus: 60 sec 94 °C, 60 sec 60 °C, 60 sec 72°C.

V.8.6. NAT2

A PCR amplifikáció után kapott terméket 3 részre osztva 3 különböző restrikciós enzimmel emésztettük (*KpnI*, *TaqI*, és *BamHI*), a leggyakoribb lassú acetiláló genotípusok azonosítására. Az esetek 95%-ában ezen allélek /M1 (*KpnI*), M2 (*TaqI*), M3 (*BamHI*)/ jelenléte felelős a NAT2 alacsony aktivitásáért (lassú acetilálók). Lassú acetilálóknak tekintettük a vizsgált személyt, ha a vad típusú allél nem volt jelen, hanem mindkét allélje „lassú” allél volt (162).

Primerek: GGAAACAAATTGCACCTTGG
TCTAGCATGAATCACTCTGCG

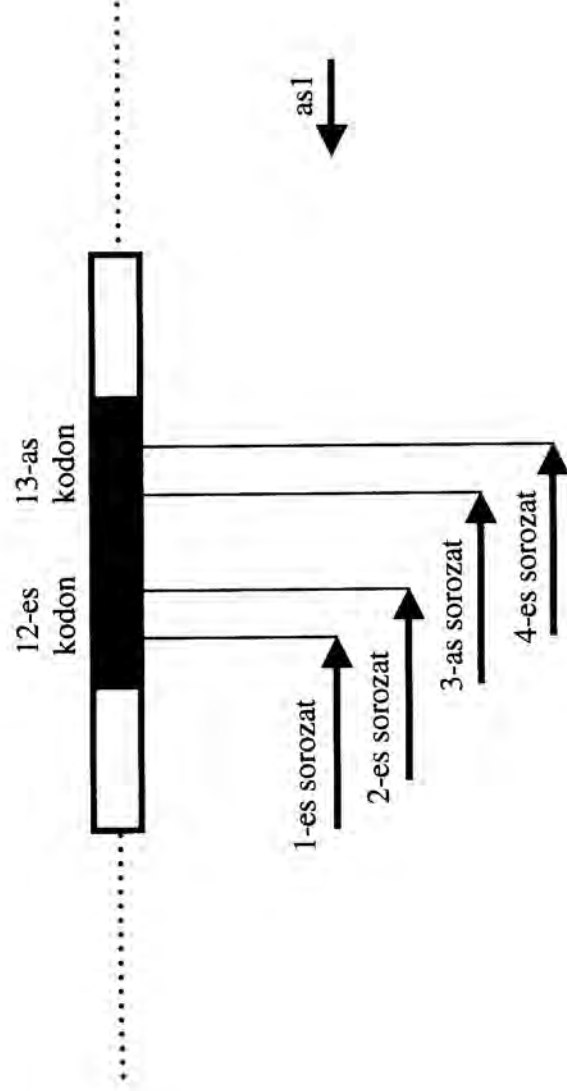
Reakcióelegy: 60 µl össztérfogatban 20 µl DNS templát, 50-50 pmol primer, 4x0.2 mM dNTP, 1 U *Taq* DNS polimeráz, 2 mM MgCl₂, 6 µl 10x puffer, 80 µg/ml bovin szérumalbumin
PCR-reakció: 4 perc 94 °C, majd 30 ciklus: 30 sec 94°C, 30 sec 57 °C, 90 sec 72 °C, végül 5 perc 72 °C. Emésztés: 3x20 µl-re szétosztva 2-2 U *KpnI*, *TaqI*, és *BamHI* enzimekkel.

V.9. K-ras pontmutációk vizsgálata

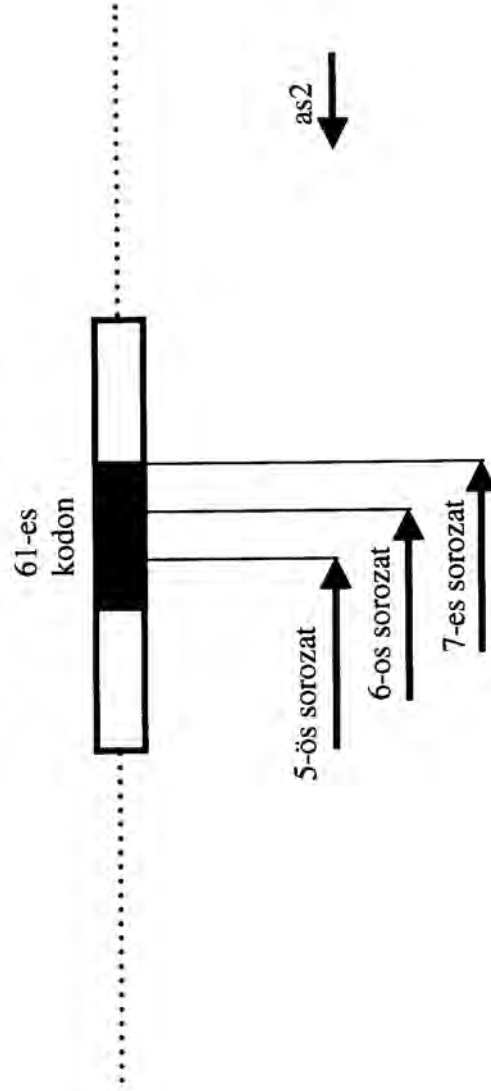
A vizsgálat mutáns allél specifikus amplifikáció (MASA) segítségével történt (163). Lényege, hogy a lehetséges mutáns bázisokkal komplementer primereket tartalmazó primerkeverékekkel végeztünk PCR-reakciót, a *K-ras* 12-es és 13-as kodon első két bázisát, illetve a 61-es kodon mindhárom bázisát vizsgálva (a néma mutációkat nem vizsgáltuk) (7. ábra).

as1:CTCATGAAAATGGTCAGAGAAACC	PP4c GTGGTAGTTGGAGCTGGTGA
PP1a ACTTGTGGTAGTTGGAGCTC	as2 ACTATAATTACTCCTTAATGTCAGC
PP1b ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT	PP5a TATTCTCGACACAGCAGGTG
PP1c ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA	PP5b TATTCTCGACACAGCAGGTT
PP2a CTTGTGGTAGTTGGAGCTGC	PP5c TATTCTCGACACAGCAGGTA
PP2b CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT	PP6a ATTCTCGACACAGCAGGTCC
PP2c CTTGTGGTAGTTGGAGCTGA	PP6b ATTCTCGACACAGCAGGTCC
PP3a TGTGGTAGTTGGAGCTGGTC	PP6c ATTCTCGACACAGCAGGTCT
PP3b TGTGGTAGTTGGAGCTGGTT	PP7a TTCTCGACACAGCAGGTTCGT
PP3c TGTGGTAGTTGGAGCTGGTA	PP7b TTCTCGACACAGCAGGTCCG
PP4a GTGGTAGTTGGAGCTGGTGC	
PP4b GTGGTAGTTGGAGCTGGTGT	

EXON 1



EXON 2



7. Ábra. A K-ras 12-es, 13-as és 61-es kodonok pontmutációinak kimutatása mutáns allél specifikus amplifikációval

A 12-es kodon első bázisának mutációját PCR reakcióval, az as1 antiszensz primerrel és a 3 lehetséges mutáns bázis komplementerét tartalmazó 1-es sorozatú primerkeverékkel végeztük. Ha amplifikációt észleltünk, az mutáció meglétét jelenti, ekkor a 3 primerrel külön-külön amplifikációt végeztünk a mutáció pontos típusának megállapítására. A többi bázishoz tartozó primer sorozatok az ábrán láthatók. A 61-es kodon vizsgálatához az as2 antiszensz primert használtuk.

V.10. Comet-assay (SCGE=single cell gel electrophoresis)

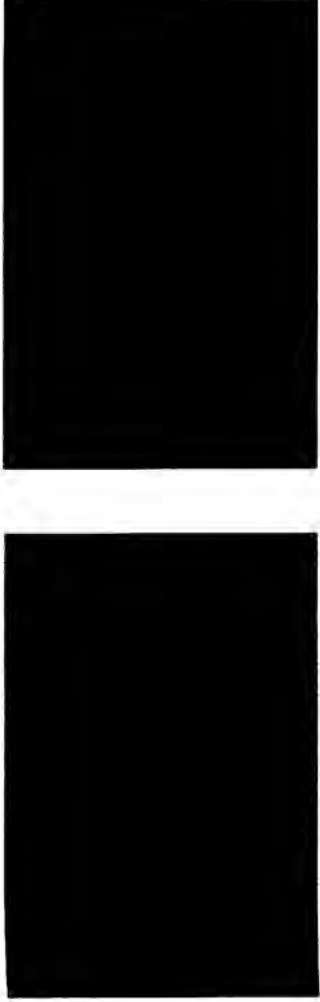
A sejtek agaróz gélben történő immobilizálása és a maghártya roncsolása után alkálikus közegben történő gélelektroforézist végeztünk (164), majd a lemezeket etídium-bromidos festés után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Ekkor a lánc töréseket szenvedett, rövidebb DNS-szakaszok gyorsabban migrálnak (az üstökös csóvája), mint a mag többségét adó ép, hosszú láncú DNS (az üstökös feje). A lánc törések arányának meghatározása a csóva méretének és intenzitásának a fejhez viszonyításával történik, az ún. tail-moment (165) számításával Comet Analysis szoftver segítségével (Euclid Analysis, St. Louis, MO, USA) (8. ábra). Lemezenként 50 üstökösértékelünk.

V.11. Sejtek izolálása székletből (Comet-assay-hez)

Az izolálás a széklet N-acetilciszteint tartalmazó oldatban 4 °C-on történő diszpergálását követő PERCOLL centrifugálással történt (166).

V.12. A 2x2 napos táplálkozási útmutató a DNS-lánc törések vizsgálatánál

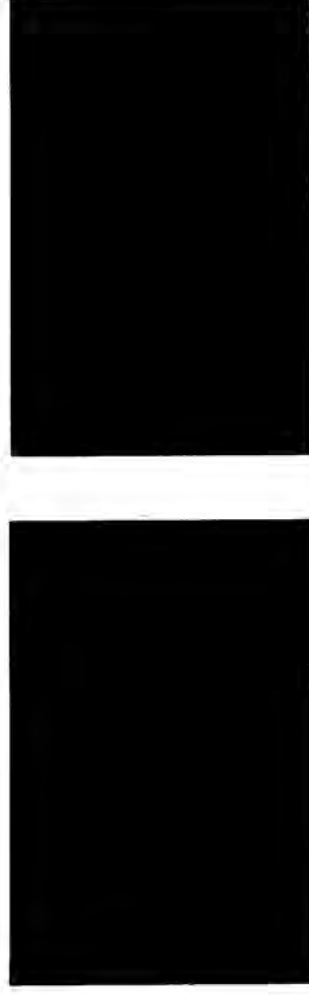
Az első két napon hús- és húskészítmények fogyasztása tilos. Tej, tojás megengedett, más korlátozás nincs. A második két napra megadott minimális fogyasztási követelmények húsfélékből (naponta): 20 dkg füstölt kolbász, 2 szelet sült hús (kb. 8-8 dkg), 4 hamburger.



Enyhe DNS-károsodást mutató kép. Az üstökös csóvája nem, vagy csak alig látszik, fluoreszcencia szinte kizárólag a fejben észlelhető.



Az egyes lánctörések jelenléte – a DNS feltöredezése – jól látszik abból, hogy a fej mögött határozottan észlelhető csóva alakult ki. A fluoreszcencia jelentős része még mindig a fejben van, tehát a DNS állomány nagyobb része még intakt.



Nagymérvű DNS-károsodás. A DNS-állomány nagyobb része a csóvában található, töredezett DNS-fragmentumokból áll.

8. Ábra. Comet-assay.

VI. Eredmények, megbeszélés

VI.1. A daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálata

VI.1.1. GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 polimorfizmusok összefüggése a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatával.

Eset-kontroll vizsgálatban 163 colorectalis daganatos beteget genotívizáltunk GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 génekre vonatkozóan, és az allégyakoriságokat összehasonlítottuk a kontroll populációban talált allégyakoriságokkal (167). A minták egy része formalinos tumorminta, illetve a rezekált bélből származó makroszkopikusan egészséges béldarab volt, másrészt pedig archív, paraffinba ágyazott blokkokat illetve metszeteket használtunk (mivel a betegek genotípusának meghatározását végeztük el, ezért tulajdonképpen bármilyen, testi sejteket tartalmazó minta megfelelő). A minták a BM Központi Kórházból, illetve a Baranya Megyei Kórház Pathologiai osztályáról származtak. Az önként vállalkozó, daganatos betegségben nem szenvedő kontroll személyekből vérmintákat használtunk, itt az esetek egy részében (ujjbegyéből történő vérvételnél) közvetlenül teljes vérből történt a PCR vizsgálat, míg más részükben előzetesen a vérmintából DNS-t izoláltunk. A kontroll csoport összeállításánál a kor és nem szerinti összetételt a kísérleti csoporthoz igazítottuk. Mivel nem az örökletes daganatot okozó tényezők szerepét kívántuk vizsgálni, csak olyan betegek kerültek a vizsgálatba, akiknél az anamnéziséből örökletes daganat nem volt valószínűsíthető (családi halmozódás, kolonoszkópia vagy korábbi molekuláris biológiai vizsgálatok nem utaltak rá).

Az átlagéletkor a kísérleti és a kontroll csoportban 59.2 ± 18.4 és 59.7 ± 21.3 év volt. A férfi/nő arány mindkét csoportban 0.57/0.43 volt. A daganatok

megoszlása lokalizáció szerint az alábbi volt: jobb oldali: 47, bal oldali: 62, rectum: 54. A diagnózis felállításához minden esetben szövettani vizsgálat történt, a daganat típusa mindegyik betegnél adenocarcinoma volt. Az allélmegoszlásokat az III. és IV. táblázat mutatja, a kontroll és a daganatos csoportban.

<u>GSTM1</u>	<u>CYP1A1</u>	<u>CYP2E1</u>
0: 72 (47%)	Ile/Ile: 132 (81.0%)	c1/c1: 140 (85.6%)
+: 91 (55.8%)	Ile/Val: 31 (19.0%)	c1/c2: 23 (14.4%)
	Val/Val: –	c2/c2: –

III. Táblázat. Genotípusok megoszlása a kontroll-csoportban (n=163)

<u>GSTM1</u>	<u>CYP1A1</u>	<u>CYP2E1</u>
0: 79 (48.5%)	Ile/Ile: 119 (73.0%)	c1/c1: 124 (76.1%)
+: 84 (51.5%)	Ile/Val: 41 (25.2%)	c1/c2: 37 (22.7%)
	Val/Val: 3 (1.8%)	c2/c2: 2 (1.2%)

IV. Táblázat. Genotípusok megoszlása a daganatos csoportban (n=163)

A kontroll csoport allélmegoszlása mindhárom vizsgált gén tekintetében hasonló volt az irodalmi adatok alapján fehér populációkra vonatkozóan közölt eloszlásokhoz (27, 54, 56, 81). A kontroll populációban ritka homozigóta sem a CYP1A1 sem a CYP2E1 enzimre nézve nem volt, a GSTM1 homozigóta 0 genotípus arányát pedig nem egészen 50%-nak találtuk. **A magyarországi népesség átlagos allélmegoszlásai tehát a fenti három enzim tekintetében más európai populációkéhoz hasonlóak (27, 56, 81, 167).**

A feltételezett "high-risk" allélek (CYP2E1 c2, CYP1A1 Val és GSTM1 0) és a colorectalis daganatok közötti kapcsolatot az V. táblázat illusztrálja. Mivel a ritka homozigóták előfordulási gyakorisága csekély, ezért a CYP1A1 és a CYP2E1 enzimnél a ritka homozigótákat a heterozigótákkal közös csoportba soroltuk, és így végeztük el a kockázat kiszámítását.

GSTM1 0 allél	OR: 1.19 95% CI: 0.75 – 1.35
CYP1A1 Val allél	OR: 1.57 95% CI: 0.90 – 2.74
CYP2E1 c2 allél	<u>OR: 1.91 95% CI: 1.05 – 3.52</u>

V. Táblázat. Metabolizáló enzimek allépolimorfizmusa és a colorectalis daganatok előfordulása közötti kapcsolat.

Bár a feltételezett “high-risk” allél mind a GSTM1 mind a CYP1A1 enzimnél gyakoribb volt a betegek között, mint a kontroll csoportban, a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A CYP2E1 enzim c2 alléljét hordozók viszont statisztikailag szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a daganatos csoportban, mint a kontrolloknál.

Ha mindhárom “high-risk” allél egyidejű előfordulását vizsgáltuk, akkor a kontrollok között 3 ilyen személyt találtunk, míg a daganatos betegek csoportjában 13-at (OR: 4.62 95% CI: 1.23 – 25.68). Ez azt jelenti, hogy ha valaki mindhárom “high-risk” allélt hordozza, akkor a colorectalis daganat kialakulásának kockázata már jelentősebb mértékben megnőtt. Sikerült tehát igazolnunk, hogy több, önmagában véve csak kis kockázatemelkedést okozó tényező egyidejű jelenléte nagy mértékben (OR: 4.62) emelte a colorectalis daganatok kialakulásának kockázatát. Ez a gyakorlat számára azért lehet lényeges, mert demonstrálja, hogy minél több genetikai tényezőt vonunk be a vizsgálatba, annál inkább az egyén számára is használható (és nem csak csoportszintű) kockázatbecslést adhatunk.

VI.1.2. K-ras mutációs státusz és a mutációk prognosztikus értékének vizsgálata

Hogy saját anyagunkon tisztázzuk a K-ras onkogén pontmutációinak esetleges prognosztikus jelentőségét, vastag- illetve végbéldaganatok mutációs státuszát összevetettük a rendelkezésre álló klinikopathologiai adatokkal, illetve a betegek túlélésével. Az elemzést a BM Központi Kórházából

származó 88 archív mintán végeztük el, a betegek kórtörténetére vonatkozó adatokkal összevetve (168, 169).

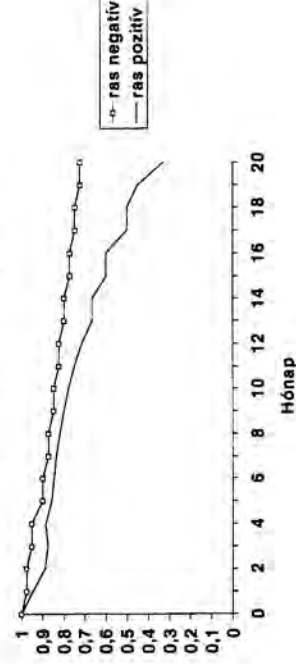
A betegek átlagéletkora 61.9 év volt (27-80), nem szerinti megoszlása 48 férfi – 40 nő. A Dukes szerinti stádiumbeosztás alapján B stádiumban 42, C stádiumban 36, D stádiumban 10 beteg volt a műtét időpontjában. A tumor lokalizációja szerinti megoszlás: jobb oldali 22, bal oldali 30, végbél 36 esetben. A *K-ras* pontmutációk előfordulását a daganat lokalizációja, nem és Dukes stádium szerinti megoszlásban a VI. táblázat mutatja.

A *K-ras* pontmutációk előfordulása nem mutatott szignifikáns összefüggést azzal, hogy a daganat a vastagbélben vagy a végbélben helyezkedett el. A daganat lokalizációja szerint további csoportosítás viszont azt mutatta, hogy a **jobb oldali elhelyezkedésű daganatokban gyakoribb volt a *K-ras* pontmutációk előfordulása, mint bal oldalon vagy a rectumban** (jobb oldal poz/neg: 16/6, bal old: 17/13, rectum: 22/14).

A Dukes stádiumok szerint vizsgálva szignifikánsan gyakoribb volt a ***K-ras* pontmutációk jelenléte a B stádiumú betegekben, mint a C stádiumban** (B poz/neg: 24/18, C: 27/9, $p<0.05$).

Az átlagos túlélést és a progresszióig eltelt időt tekintve a különbség nem volt szignifikáns a *K-ras* pontmutációk előfordulása szerint: Átlagos túlélés a *K-ras* pozitív csoportban 21.0 hónap, a *K-ras* negatív csoportban 21.2 hónap, a progresszióig eltelt idő pedig 13.6 hónap – 14.2 hónap volt. **Dukes B stádiumú betegek esetén viszont szignifikánsan különbözött az átlagos túlélés** (*K-ras* neg.: 31.5 hónap, *K-ras* poz.: 30.8 hónap, $p<0.05$) és a **progresszióig eltelt idő** (*K-ras* neg.: 22.0 hónap, *K-ras* poz.: 17.7 hónap, $p<0.01$) (9. ábra).

9. Ábra. *K-ras* mutációk előfordulása és a progresszióig eltelt idő Dukes B stádiumú betegekben



NEM	LOKALIZÁCIÓ	RAS POZITÍV	RAS NEGATÍV	ÖSSZES
Dukes B stádium				
Nő	Colon	5	5	10
	Rectum	6	4	10
Férfi	Colon	8	6	14
	Rectum	5	3	8
Dukes C stádium				
Nő	Colon	11	2	13
	Rectum	3	0	3
Férfi	Colon	8	2	10
	Rectum	5	5	10
Dukes D stádium				
Nő	Colon	1	2	3
	Rectum	0	1	1
Férfi	Colon	2	0	2
	Rectum	3	1	4
Összes		54	34	88

VI. táblázat. K-ras pontmutációk előfordulása colorectalis daganatos betegekben

Vizsgálatunk tehát alátámasztja azt a feltételezést, hogy a **K-ras pontmutációk előfordulása a vastagbél-daganatos betegek egyes csoportjaiban prognosztikus tényező, mégpedig rosszabb prognózis jele.** Esetünkben ezt a Dukes B stádiumú betegek csoportjára nézve sikerült igazolni. Ez összhangban van azokkal a korábbi vizsgálatokkal, amelyek szintén a **K-ras** pontmutációk prognosztikus értékét tanulmányozták, és azt a rosszabb prognózis jelének tartották (170-172).

VI.1.3. K-ras pontmutációk jelenlétének összefüggése a metabolizáló enzimek polimorfizmusaival,

Az VI.1.1. vizsgálatban leírt eredményeink azt mutatták, hogy a metabolizáló enzimek "high-risk" alléljai fokozzák a colorectalis daganatok kialakulásának kockázatát. Az VI.1.2. részben pedig azt igazoltuk, hogy a **K-ras** pontmutációk befolyásolhatják – a betegek egyes alcsoportjaiban – a

betegség prognózisát. Ezért most arra próbáltunk választ kapni, hogy ha kialakul a daganat, akkor a **metabolizáló enzimek egyes alléljei „hajlamosítanak-e” olyan típusú daganatfejlődésre, amely K-ras pontmutációval jár.** Ehhez a vizsgálathoz a BM Központi Kórházából és a Baranya Megyei Kórház Pathologiai Osztályáról egy másik – 140-es elemszámú – betegcsoportból származó, formalinnal fixált daganatmintákat illetve paraffinos metszeteket használtunk fel és vizsgáltunk a K-ras mutációk jelenlétére vonatkozóan. Genotipizáltuk továbbá a GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 metabolizáló enzimek génjeit, és az allépolimorfizmus-megoszlásokat összevetettük a K-ras mutációk előfordulásával (173, 174).

Ebben a betegcsoportban a K-ras pontmutációk előfordulásának gyakoriságát és helyét a VII. táblázat mutatja:

12-es kodon	13-as kodon	61-es kodon
39 (27.9%)	22 (15.7%)	3 (2.1.%)
Összesen: 64 (45.7%)		

VII. Táblázat. K-ras pontmutációk előfordulása colorectalis daganatmintákban.

A mutációk pontos típusát és lokalizációját a VIII. táblázat tartalmazza.

	12-ES KODON (60.9%)		13-AS KODON (34.4%)			61-ES KODON (4.7%)		
	GGT	GGT	GGC	GGC	CAA	CAA	CAA	CAA
<u>A</u>	5	17	2	7	0	-	-	-
<u>T</u>	7	6	3	6	1	0	0	0
<u>G</u>	-	-	-	-	0	2	0	0
<u>C</u>	0	4	2	2	-	0	0	0

VIII. Táblázat. A talált K-ras pontmutációk lokalizációja és fajtái.

A vizsgálat legfontosabb kérdése, hogy vajon a *metabolizáló* enzimek genotípusa befolyásolja-e a kialakult daganatban a *K-ras* pontmutációk jelenlétét. Ha igen, akkor ez azt jelentené, hogy a *metabolizáló* enzimek bizonyos alléljei más-más irányú daganatfejlődésre hajlamosítanak. A *metabolizáló* enzimek allélpolimorfizmusának és a *K-ras* pontmutációk összefüggésének tisztázásához megvizsgáltuk, hogy a *K-ras* pozitív illetve *K-ras* negatív tumorok milyen arányban fordultak elő a *metabolizáló* enzimek "high-risk" illetve "low-risk" alléljait hordozók között (IX-X. táblázat).

	K-ras pozitív	K-ras negatív
GSTM1 0 genotípusúak	40	31
CYP1A1 Val allélt hordozók	21	19
CYP2E1 c2 allélt hordozók	21	11

IX. Táblázat. *K-ras* mutációk előfordulása a "high-risk" *metabolizáló* csoportjában

	K-ras pozitív	K-ras negatív
GSTM1 + genotípusúak	24	45
CYP1A1 Ile homozigóták	43	57
CYP2E1 c1 homozigóták	43	65

X. Táblázat. *K-ras* mutációk előfordulása a "low-risk" *metabolizáló* csoportjában

A táblázatba foglalt adatok alapján kiszámítottuk, hogy van-e kapcsolat egyes allélek és a *K-ras* pontmutációk jelenléte között. Ekkor az alábbi összefüggéseket találtuk (XI. táblázat):

GSTM1 0 allél		
Összes <i>K-ras</i> mutáció: Csak a 12-es kodon mutációira:	<u>OR: 2.42</u> <u>OR: 2.30</u>	<u>CI: 1.16-5.08</u> <u>CI: 1.00-5.36</u>
CYP2E1 c2 allél		
Összes <i>K-ras</i> mutáció:	<u>OR: 2.89</u>	<u>CI: 1.18-7.16</u>
CYP1A1 Val allél		
Összes <i>K-ras</i> mutáció:	OR: 1.47	CI: 0.66-3.26

XI. Táblázat. *K-ras* pontmutációk jelenléte és a metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai közötti kapcsolat.

A **GSTM1 0** és a **CYP2E1 c2** allélt hordozó betegek daganatmintáiban statisztikailag szignifikánsan gyakoribbak voltak a *K-ras* gén pontmutációi, mint a **GSTM1 +** vagy a **CYP2E1 c2** allélt hordozók között. A **CYP1A1** enzim alléljeire vonatkozóan ez a kapcsolat nem volt statisztikailag szignifikáns. A **GSTM1 0** allélnél – mivel itt az 50% körüli allélmegoszlás miatt az egyes alcsoportokban is viszonylag magas elemszámok voltak – ez az összefüggés statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a mutációk egyik alcsoportjára, a 12-es kodon mutációira vonatkozóan is.

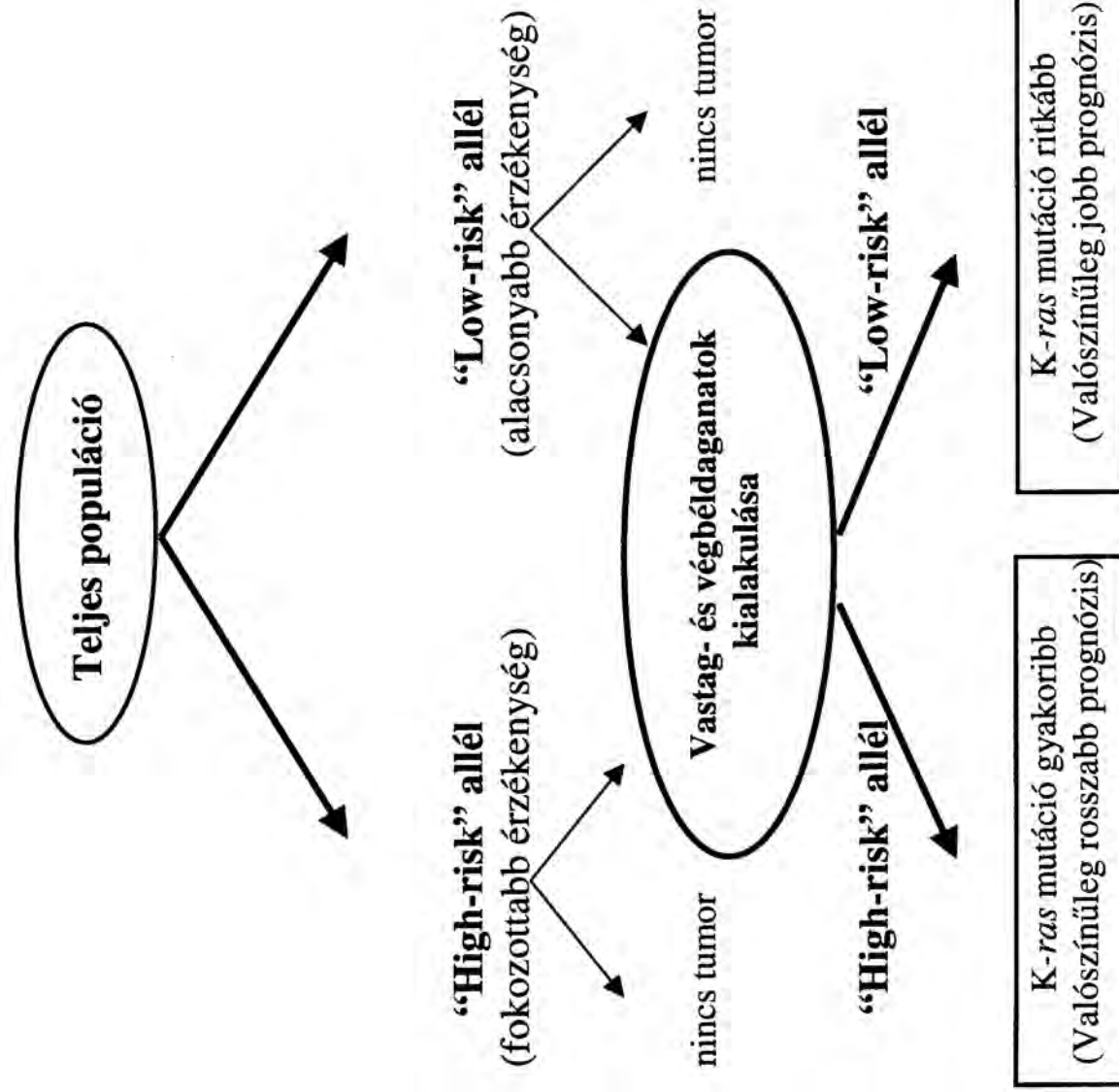
A vastagbél-daganatokban található szomatikus *K-ras* mutációk és a genetikai polimorfizmusok kapcsolatát eddig két szerző vizsgálta, mindketten a NAT2 rapid- illetve lassú acetilálók viszonylatában. Oda és mtsai szerint a *K-ras* pontmutációk előfordulása gyakoribb a rapid acetilálók között (175), míg Hardingham és mtsai – csak a 12-es kodon mutációit elemezve – nem találtak ilyen összefüggést (170). Mivel CYP és GST enzimek vonatkozásában ilyen irodalmi adatok nincsenek, ezért vizsgálatunkat nem tudjuk mások adataival összevetni. Saját eredményeink Oda és mtsai vizsgálatával mutatnak hasonlóságot, ahol szintén a „high-risk” alléleket hordozók között volt gyakoribb a *K-ras* pontmutációk előfordulása.

Az eredmények tehát azt mutatják, hogy a vizsgált metabolizáló enzimek nem csak a colorectalis daganatok iránti egyéni érzékenységet befolyásolják, hanem azokban a személyekben, akikben kialakul daganat, annak más-más irányú – *K-ras* pontmutációkkal járó illetve anélküli – fejlődésére hajlamosítanak. Ez a metabolizáló enzimek genetikai

polimorfizmusainak alkalmazási területét kiszélesíti, a prediktív molekuláris epidemiológiától a kuratív medicinában – prognosztikus markerként – való felhasználásig.

A **primer prevencióban** való lehetséges felhasználás a korábban ismertett, egyéni érzékenységet moduláló hatáson alapul: A nagyobb kockázatú, **“high-risk” allélok**at hordozó személyeknek **fokozott elővigyázatosságot** kell tanúsítaniuk bizonyos környezeti karcinogén **expozíciókkal szemben**. Jelenleg még viszonylag ritka azon vizsgálatok száma, ahol sikerült kölcsönhatást bizonyítani valamely metabolizáló enzim allépolimorfizmusa és egy környezeti tényező között. A tüdőrák viszonylatában a GSTM1 0 genotípus és a dohányzás, vagy a colorectalis daganatoknál az átsütött húsok fogyasztása és a NAT2 rapid acetiláló genotípus között valószínű ilyen kölcsönhatás jelenté (176).

A **K-ras pontmutációkkal** való **összefüggés viszont egy lehetséges klinikai aspektusra hívja fel a figyelmet**: Mivel a **K-ras** pontmutációk jelenté prognosztikus markerként szolgálhat (171), feltehető, hogy a metabolizáló enzimek polimorfizmusai is prognosztikus értékűek. Ezt természetesen további vizsgálatokkal szükséges megerősíteni, illetve közvetlenül kell tanulmányozni a metabolizáló enzimek és a daganat prognózisának összefüggését. Eredményeink megerősítése esetén egyes allépolimorfizmusok új, önálló prognosztikus markerként szolgálhatnak, tovább finomítva a terápia megválasztásának lehetőségeit. Vizsgálatunk eredményei alapján a metabolizáló enzimek polimorfizmusainak a colorectalis daganatokkal való kapcsolatáról felállított modellünket a 10. ábra foglalja össze. Meg kell jegyezni, hogy vizsgálatunkban csak két metabolizáló enzim (CYP2E1 és GSTM1) **“high-risk”** alléjára igazoltuk a **K-ras** pontmutációk előfordulásával való összefüggést, tehát az ábrán általánosítva feltüntetett összefüggések a többi enzim vonatkozásában egyelőre csak hipotézisek.



10. Ábra. Metabolizáló enzimek allépolimorfizmusai és a colorectalis daganatok kialakulása közötti kapcsolat

VI.1.4. A vastag- és végbéldaganatok összefüggése további metabolizáló enzimekkel (GSTT1 és NAT2) valamint a p53 tumor szuppresszor gén allépolimorfizmusával.

Mint az a bevezetésből is kiderült, nem csak az előzőekben vizsgált 3 enzim (GSTM1, CYP2E1, CYP1A1), hanem más enzimek polimorfizmusai is hatással lehetnek a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatára (92). A GSTM1 enzimhez hasonlóan **felmerül más GST-k szerepe is**, hiszen a glutationnal való konjugáció – bármelyik enzim végezze is azt – mindenképpen detoxikáló hatású. Logikusnak tűnik tehát, hogy a többi GST enzimnek akkor lehet nagy szerepe, ha a GSTM1-re nézve a vizsgált személy homozigóta 0 genotípusú. Ekkor a **hiányzó detoxikáló kapacitást** – illetve a különböző szubsztrátspecifitást, valamint az eltérő szervenkénti expresszió miatt annak csupán egy részét – **pótolhatja például a GSTT1 enzim** működése. A GSTT1 vizsgálata technikai szempontból sem bonyolult, mivel itt is – a GSTM1-hez hasonlóan egy deléciót kell igazolni. Ráadásul a **GSTT1 és GSTM1 polimorfizmusok egy PCR reakcióval, szimultán amplifikációval vizsgálhatók** (160).

Ha pontos képet akarunk kapni a sporadikus vastag- és végbéldaganatok kialakulásáról, akkor **nehezen mellőzhető a NAT2 enzim polimorfizmusainak vizsgálata**. Az enzim expresszálódik a vastagbélben, és szubsztráinjai között heterociklusos aminosavak is szerepelnek, amelyek viszont megtalálhatók táplálékunkban (84). Különösen magas koncentrációban vannak jelen ezek a vegyületek a húst bőségesen, és főként grillezve, füstölten és erősen megsütve (ez a ma széles körben elterjedt, úgynevezett “Western-diet”-re is igaz) fogyasztó személyekben. A fentiek értelmében számos szerző vizsgálta már a colorectalis daganatok és a NAT2 allépolimorfizmusok kapcsolatát, többnyire arra az eredményre jutva, hogy a rapid acetilálók kockázata valamivel magasabb (91, 92, 177). Ettől eltérő eredmények is születtek, és a vizsgálatokat azért is nehéz összehasonlítani, mert a genotipizálásra különféle módszereket használtak, illetve néhányan a fenotípus – vagyis az enzimaktivitás mérése – alapján csoportosítottak, és ráadásul a vizsgált populációk allélmegoszlása is különböző volt (91, 178). Mivel magyar populációban nem ismeretesek a NAT2 allépolimorfizmusok megoszlására vonatkozó adatok, ezért **szükségesnek láttuk a NAT2 enzim**

genotipizálását elvégezni, és egyúttal vizsgálni a vastag- és végbéldaganatok iránti egyéni érzékenységre kifejtett hatását.

Végül, bár nem a metabolizáló enzimek családjába tartozik, célszerűnek tűnt a *p53* tumor szuppresszor gén allélpolimorfizmusainak vizsgálata is. A bevezetésben részletezett módon ugyanis a *p53* 72-es kodon *Arg/Pro* polimorfizmus is befolyásolja egyes daganatok kialakulásának kockázatát (105, 161). Meglepő módon a vastag- és végbéldaganatokra vonatkozó eredmények e tekintetben gyakorlatilag teljesen hiányoznak – a *p53* polimorfizmusok vizsgálatával foglalkozó szerzők elsősorban a tüdő- és méhnyakrákra koncentráltak (102, 103, 106). Mivel igen sok bizonyíték van a *p53* tumor szuppresszor gén érintettségére a vastag- és végbéldaganatok kialakulása során (117), ezért logikus a *p53* gén szerepét ezen daganatok iránti egyéni érzékenységre vonatkozóan is megvizsgálni.

Mivel az előző kísérletben vizsgált polimorfizmusokat ismét teszteltük, összesen 6 különböző genetikai polimorfizmus és a colorectalis daganok iránti érzékenység elemzését végeztük el jelen kísérletünkben, újabb betegcsoporton. A vizsgált 97 minta mindegyike a Baranya Megyei Kórház Pathologiai osztályáról származott, és colorectalis daganatos betegektől (szövetteni diagnózis: adenocarcinoma) származó formalinnal fixált daganatos- és egészséges bélszakaszokat tartalmazott (179).

A genotipizálások eredményeit a XII-XIII. táblázatok mutatják.

GSTMI	GSTT1	NAT2	CYP1A1	CYP2E1	P53
+	77	Lassú: 56	Ile/Ile: 76	c1/c1: 81	Arg/Arg: 62
0:	20	Rapid: 41	Ile/Val: 21	c1/c2: 16	Arg/Pro: 29
			Val/Val: 0	c2/c2: 0	Pro/Pro: 6

XII. Táblázat. A vizsgált allélek előfordulása egészséges, kontroll csoportban (n=97)

GSTM1	GSTT1	NAT2	CYP1A1	CYP2E1	P53
+: 44	+: 72	Lassú: 43	Ile/Ile: 69	c1/c1: 75	Arg/Arg: 47
0: 53	0: 25	Rapid: 54	Ile/Val: 27	c1/c2: 21	Arg/Pro: 38
			Val/Val: 1	c2/c2: 1	Pro/Pro: 12

XIII. Táblázat. A vizsgált allélel előfordulása colorectalis daganatos betegek között (n=97)

A kontroll csoport allélgyakoriságait tekintve azt láthatjuk, hogy ezek egyik vizsgált polimorfizmus tekintetében sem térnek el lényegesen más európai populációkban észlelt gyakoriságoktól (27, 56, 76, 92, 101).

A polimorfizmusok és a colorectalis daganatok kapcsolatát a XIV. táblázat mutatja:

A VIZSGÁLT ALLÉLPOLIMORFIZMUSOK	OR	95%-OS CI
GSTM1 (0 allél)	1.34	0.73-2.44
GSTT1 (0 allél)	1.34	0.65-2.76
<u>NAT2 (rapid acetilálók)</u>	<u>1.95</u>	<u>1.06-3.59</u>
CYP1A1 (Val allél)	1.47	0.73-2.97
CYP2E1 c2 allél	1.49	0.69-3.23
<u>p53 (Pro allél)</u>	<u>1.88</u>	<u>1.02-3.49</u>

XIV. Táblázat. Allélpolimorfizmusok hatása a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatára

Statisztikailag szignifikáns kockázatemelkedést nem találtunk a CYP2E1, CYP1A1, GSTM1 és GSTT1 enzimeknél, viszont fokozott volt a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának rizikója a NAT2 rapid acetilálókban és a p53 Pro allélt hordozó személyekben. A CYP2E1 esetén az előző vizsgálatunk statisztikailag szignifikáns összefüggést adott, most azonban ez nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. Véleményünk szerint a különbség a mostani vizsgálat kisebb elemszámával indokolható, ami

miatt viszonylag kevés volt a CYP2E1 ritka alléllal (c2) rendelkezők száma a mintában.

A gén-gén kölcsönhatások megítélésénél azt elemeztük, hogy milyen gyakran fordulnak elő egyes "high-risk" allélpárok a betegek között és a kontroll populációban (XV. táblázat). Ebben a fázisban csak páronként vizsgáltunk, és nem elemeztük a többi polimorfizmust, az esetleges hármas, négyes, stb. "high-risk" kombinációkat. A táblázatban csak azokat az allélkombinációkat tüntettük fel, amelyeknél statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a colorectalis daganatos és a kontroll csoport között.

GENOTÍPUS-KOMBINÁCIÓK	ELŐFORDULÁS BETEG	KONTROLL	OR	95%-OS CI
GSTM1 0 / NAT2 rapid	38	16	<u>3.26</u>	<u>1.58-6.77</u>
GSTM1 0 / GSTT1 0	18	6	<u>2.22</u>	<u>1.14-10.42</u>
GSTM1 0 / p53 Pro	28	12	<u>2.87</u>	<u>1.29-6.50</u>
NAT2 rapid / p53 Pro	32	10	<u>4.28</u>	<u>1.86-10.09</u>

XV. Táblázat. Gén-gén kölcsönhatások a colorectalis daganatok kialakulásában. "High-risk" allélek együttes előfordulása.

Figyelemre méltó, hogy az önmagában szignifikáns kockázatemelkedést nem okozó GSTM1 0 allél jelentősen fokozta mind a NAT2 rapid acetilálók, mind pedig a p53 Pro allélt hordozók kockázatát. A korábbi vizsgálatunkban talált jelenség, miszerint az egyes "high-risk" allélek egyidejű jelenléte komoly kockázatemelkedést jelent, most tehát további gén-gén interakciók kapcsán igazolódott be. Hangsúlyozni kell továbbá, hogy a GSTM1 0 genotípus a GSTT1 0 genotípussal kombinálva már statisztikailag szignifikáns kockázatemelkedést (OR: 2.22 95% CI 1.14-10.42) okozott, annak ellenére, hogy önmagában egyik polimorfizmus hatása sem volt szignifikáns. Ez nagyon jól magyarázható azzal, hogy mindkét enzim funkcióképtelensége esetén a GST-kapacitás jelentősen csökken.

Adataink alapján nem vállalkozhatunk arra, hogy az allélpolimorfizmusok közötti interakciót statisztikailag modellezzük, de a

kölcsönhatás létezését több "high-risk" allélpár esetén is igazoltuk. E kölcsönhatások pontos leírása, számszerűsítése értékes információkat szolgáltatna a daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálatában, és megkönnyítené ezen biomarkerek preventív célú felhasználását. A jelen vizsgálat folytatásként a későbbiekben szeretnénk a minta elemszámának növelésével lehetővé tenni az allélpolimorfizmusok közötti kölcsönhatások értékelését, ami közvetlenül megelőzi az egyéni szintű kockázatbecslés alkalmazását.

Más megközelítéssel úgy is vizsgálhatjuk a gén-gén kölcsönhatásokat, hogy a beteg illetve a kontroll csoporton belül összehasonlítjuk, hogy a vizsgált személyek egyidejűleg hány "high-risk" allélt hordoznak (XVI. táblázat).

"HIGH-RISK" ALLÉLEK SZÁMA / SZEMÉLY	ELŐFORDULÁS BETEG KONTROLL	
0	0	4
1	8	18
2	21	37
3	35	26
4	27	12
5	5	0
6	1	0

XVI. Táblázat. "High-risk" allélek száma a vizsgált személyekben.

Lényeges, hogy a legalább négy "high-risk" allélt hordozó személyek szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő a daganatos csoportban, mint az egészségesek között (33/12, OR: 3.65, 95% CI: 1.66-8.16). Hasonlóképpen a táblázat másik oldaláról leolvashatjuk a "low-risk" allélek protektív hatását: A kettő, vagy annál kevesebb "high-risk" allélt hordozók szignifikánsan kevesebben vannak a daganatos betegek között, mint a kontroll csoportban (29/59, OR: 0.27 95% CI: 0.14-0.52). Ez a modell lehetőséget ad arra, hogy olyan esetekben is kimutathassuk a "high-

risk” allélek hatását, amikor hataserősségük önmagában nem éri el a statisztikai kimutathatóság szintjét.

Az előbbi elemzés mutatja, hogy miképpen közeledhet a daganatok iránti egyéni érzékenység vizsgálata a csoportszintű kockázatbecslés felől egyre inkább az egyéni kockázatbecsléshez. Ha egyidejűleg számos metabolizáló enzimet – vagy más, egyéni érzékenységet befolyásoló tényezőt – vizsgálunk, akkor egyre pontosabban írhatjuk le az egyén kockázatát. Ha ez a kockázatemelkedés eléri egy bizonyos értéket, akkor már az egyén veszélytetettsége olyan mértékű, hogy tényleges intervenció szükséges, ami ekkor a kockázati tényezők kiküszöbölését, kemoprevenciót, gyakoribb orvosi ellenőrzést jelenthet. Ma még nincs egységesen elfogadott álláspont arra nézve, hogy mekkora kockázatemelkedésnél kell (lehet) preventív célú beavatkozást végezni az érintett személyeknél. Ennek vizsgálata a prediktív molekuláris epidemiológia aktuális feladata.

VI.1.5. Genetikai polimorfizmusok, környezeti expozíció és a DNS-károsodások létrejötte közötti kapcsolat

Az eddigi vizsgálatok, melyek a metabolizáló enzimek daganatok iránti egyéni érzékenységre gyakorolt hatását írták le, tulajdonképpen **nem adnak felvilágosítást arról, hogy milyen hatásmechanizmusok szerepelnek a kapott eredmények kialakításában, hanem csak a végeredményt – a daganatok kialakulásának kockázatát – regisztrálják.** Bizonyos szempontból ez nagyon lényeges, mert a gyakorlatban a kockázat számít, tehát az egyes alléleket hordozó személyek relatív kockázatait ismernünk kell. Nem ad viszont felvilágosítást arról, hogy a bekövetkező kockázatemelkedés milyen mechanizmussal jön létre.

A molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban nem ritka, hogy a kapott eredmények nem támasztják alá, vagy akár ellent is mondanak az elméleti megfontolások alapján várt értékeknek. Ilyenkor **egy-egy részfolyamat tanulmányozása sokat segíthet** abban, hogy megoldjuk a problémát, és

kiderítsük, miért nem a hipotézisünk alapján várt eredményeket kaptuk az eset-kontroll vizsgálatban.

A daganatkialakulás kockázatát igen sok tényező befolyásolja. Ezért **nagyon nehéz humán epidemiológiai vizsgálatokban viszonylag kis kockázatkülönbségeket kimutatni**, hiszen lehet, hogy a zavaró tényezők közül soknak önmagában is jelentősebb hatása van, mint az általunk tanulmányozni kívánt faktornak. Ezt a minta gondos kiválasztásával, stratifikálással, megfelelő statisztikai elemzéssel küszöbölhetjük ki, de szükség lehet a vizsgált minta elemszámának növelésére is. Ez humán vizsgálatoknál gyakran korlátokba ütközik, ugyanakkor költséges és időigényes. Ilyenkor **segíthet, ha egy olyan részfolyamatot tanulmányozunk, aminek a végpontja jól definiált, viszonylag közvetlen kapcsolatban van a vizsgált tényezővel**. Különösen előnyös ez a megközelítés, ha több tényező együttes hatását, kölcsönhatását szeretnénk tanulmányozni.

Jelen vizsgálatunkban a metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai és a colorectalis daganatok kockázata összefüggésének egy részfolyamatát tanulmányoztuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy **miként befolyásolja a metabolizáló enzimek polimorfizmusa a környezeti expozíció hatására kialakuló DNS károsodások mértékét** (mint a daganatkialakulás kockázatának esetleges korai biomarkerét).

A DNS károsodások tekintetében az **egyes láncú törések Comet-assay-vel való vizsgálatát** választottuk. A Comet-assay (SCGE=single cell gel electrophoresis) alkalmas viszonylag kis mértékű DNS-károsodás kimutatására, mint például az egyes lánc törések kialakulása, így finoman és pontosan regisztrálhatjuk a DNS-károsodás mértékét (164). A colorectalis daganatok genezisében fontos szerepe van a grillezett, erősen hőkezelt húsok fogyasztásának, ami heterociklusos aminok formájában bőséges mutagén karcinogén forrást szolgáltat. Ezek – és a más formában bekerülő mutagén hatású vegyületek – a vastagbélnyálkahártya sejteibe jutva DNS-adduktokat képezhetnek, lánc töréseket, kromoszóma-aberrációkat, stb. okozhatnak. Kísérletünkben azt próbáltuk megítélni, hogy vajon **táplálkozási eredetű expozíció hatására létrejövő DNS-károsodások mértékét befolyásolja-e, hogy a vizsgált személy a GSTM1 és a NAT2 gének melyik allélját hordozza.**

Önként vállalkozó, egészséges személyeket genotipizáltunk, és közülük véletlenszerűen kiválasztva 10 GSTM1 0 genotípusú, 10 GSTM1 + genotípusú, 10 NAT2 lassú acetiláló és 10 NAT2 rapid acetiláló személyt vontunk be a vizsgálatba. A kísérleti alanyok két napi vegetáriánus táplálkozás után székleletmintát adtak, amelyből a vastagbél faláról levált, lesodródott sejteket izoláltunk. Az ekkor elvégzett Comet-assay adta a háttér-DNS-károsodások mértékét. Ezután két napig bőséges húst tartalmazó diéta következett, majd ismét székleletmintát vettünk, és az izolált sejteken elvégzett Comet-assay eredményeként megkaptuk a modellezett környezeti expozíció hatására bekövetkezett DNS-károsodások mértékét. Eredményeinket a XVII-XVIII. táblázatok illusztrálják (180, 181):

	VEGETARIÁNUS	HÚS
GSTM1 0 *	8.9 ± 4.1	37.2 ± 14.8
GSTM1+	10.4 ± 5.4	16.9 ± 8.2

*p<0.05

XVII. Táblázat. DNS-károsodás mértéke (tail-moment) GSTM1 genotípusok szerint

	VEGETARIÁNUS	HÚS
NAT2 rapid *	12.8 ± 7.2	41.4 ± 18.3
NAT2 lassú	7.9 ± 4.4	15.2 ± 7.9

*p<0.05

XVIII. Táblázat. DNS-károsodás mértéke (tail-moment) NAT2 genotípusok szerint

A "háttér" DNS-károsodások mértéke nem különbözött az egyes genotípusok szerint. A bőséges húst tartalmazó étrend után mindegyik csoportban megemelkedett a DNS-károsodások szintje, de ez nem volt szignifikáns a GSTM1 + genotípusúak és a NAT2 lassú acetilálók között. A metabolizáló enzimek "high-risk" alléleit hordozók csoportjában viszont statisztikailag szignifikáns emelkedést találtunk.

Eredményeink tehát bizonyítják, hogy a DNS-károsodások létrehozása a metabolizáló enzimek allélpolimorfizmusai és a környezeti

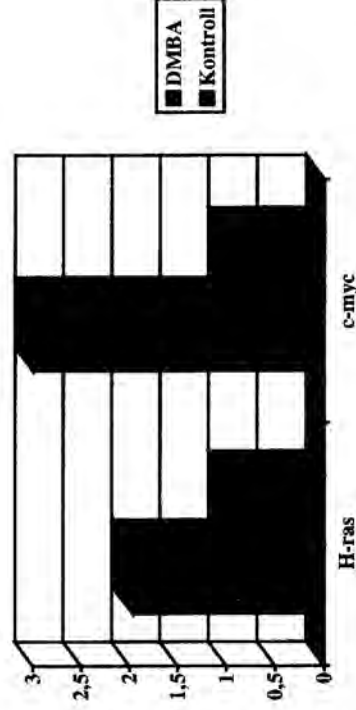
expozíció közötti kölcsönhatás eredménye. Ez összhangban van azokkal a korábbi molekuláris epidemiológiai vizsgálatokkal, amelyek – végpontként a colorectalis dagantok kialakulását nézve – kölcsönhatást találtak a NAT2 allépolimorfizmusok és a húsfogyasztás között (182). Vizsgálatunkban a “high-risk” alléleket hordozó személyekben a DNS-károsodások mértékének – vagyis a korai biológiai hatás – szintjén igazoltuk ezt a különbséget. Elképzelhető, hogy a daganatkialakulás kockázatát tekintve további folyamatokat is befolyásolnak a vizsgált allépolimorfizmusok, tehát a DNS-károsodások mértékének nem feltétlenül kell párhuzamban lenni a daganatos kockázattal.

A módszer – a székletből izolált sejtekben történő DNS-károsodások vizsgálata – **preventív célú gyakorlati felhasználása például lehetőséget ad táplálkozási tényezők, diéták, táplálkozási szokások vizsgálatára, a karcinogenitás kockázatának megítélésére, nem invazív, széles körben alkalmazható módon.** A colorectalis daganatok kialakulásának kockázatát, illetve egyes táplálkozási tényezők hatását az utóbbi években a székletből izolált DNS-ben található *K-ras* pontmutációk előfordulásával próbálják jellemezni (183, 184). Ez elsősorban a korai diagnózis, a daganatkialakulás közvetlen veszélyének jelzésére lehet alkalmas (185), azaz a *K-ras* pontmutációk kimutatása a molekuláris epidemiológia terminológiáját használva (1. ábra) a “klinikai betegség” korai biomarkereként kerül felhasználásra. Ezzel ellentétben az **általunk alkalmazott módszer korábbi végpontot vizsgál, ami a “korai biológiai hatásnak” felel meg (1. ábra), tehát a primér prevenció szempontjából is ígéretes.**

VI.2. Génexpresszió-változások vizsgálata

A 7,12-dimetilbenz[*a*]antracén (DMBA) régóta ismert környezeti karcinogén anyag, amely nagy mennyiségben fordul elő dízel motorok kipufogógázában is (186). A DMBA Long-Evans patkányokban leukémiát indukál (187), és ennek során az *N-ras* onkogén pontmutációját megtalálták már a DMBA-kezelést követő 48 órán belül, illetve a kialakult leukémiás sejtekben is (188, 189). **Jelen vizsgálatunkban tehát egy bizonyítottan karcinogén és mutagén anyag génexpresszió-változásokra kifejtett korai hatását kívántuk vizsgálni, 24 órával a kezelés után.**

Mivel a bevezetésben részletezett szempontok alapján lehetségesnek tartottuk ezen gének expresszió-változásait, a *p53* tumor szuppresszor gén, a *H-ras* és a *c-myc* onkogének expresszióját elemeztük Long-Evans patkányok májában és a lépében. A *p53* gén expressziója nem mutatott változást a kontrollhoz képest, viszont **a lépben mind a *H-ras*, mind a *c-myc* onkogének overexpressziót mutattak** (11. ábra). A *c-myc* onkogén expressziója a **kontrollokénak háromszorosa volt, és a *H-ras* expresszió is majdnem duplájára emelkedett.** A májban nem találtunk expresszió-változásokat. A szervspecifikus génexpresszió-változások összhangban vannak a DMBA leukemogén hatásával.



11. Ábra. DMBA hatására mért génexpresszió-változások (lép)

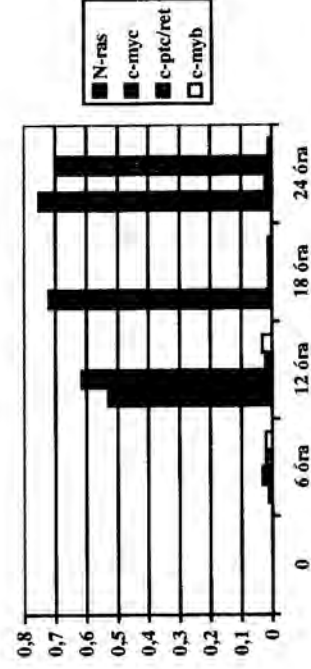
Vizsgálatunkban bizonyítottuk, hogy DMBA kezelés hatására slot-blot hibridizációval detektálható korai *in vivo* génextpresszió-változások jönnek létre Long-Evans patkányokban (190). Az irodalomban a Long-Evans patkányokban indukált leukémiával kapcsolatos legkorábbi génszintű elváltozást (N-ras pontmutáció) 48 óra múltán találták (189). A **génexpresszió-változások tehát a pontmutációk vizsgálatánál korábbi biomarkernek bizonyultak ebben a modellben.**

A ciklosporin régóta ismert – az autoimmun betegségek terápiájában, szerv- szövettranszplantáció után, és újabban a daganatok reverzans kezelésében használatos – immunszuppresszív gyógyszer, amely azonban szekunder daganatok kialakulásához vezethet (191). Mivel a ciklosporin az eddigi rendelkezésre álló adatok szerint nem genotoxikus (192) – bár létezik genotoxicitásra utaló eredmény is (193) –, részben vagy egészben nyilvánvalóan az immunszuppresszív hatása felelős a daganatkialakulásért. Elképzelhető azonban, hogy további közvetlen – mégpedig feltehetően epigenetikus – mechanizmusok is szerepet játszanak a karcinogén hatás kialakításában.

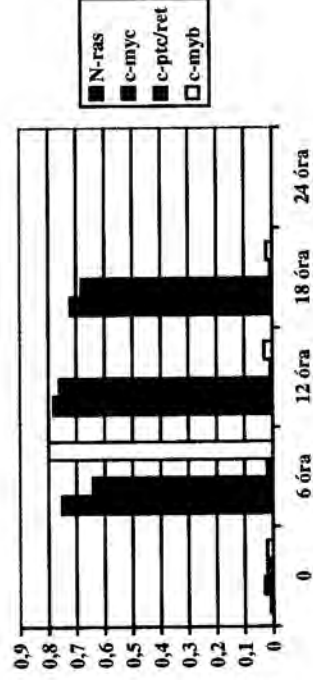
Ennek a lehetőségnek az igazolását tűztük ki célul, amikor *in vivo* ciklosporin kezelés onkogén-expresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk, a kezeléstől számított 6, 12, 18 és 24 óra múlva. A vizsgált gének a *c-sis*, *c-myc*, *c-myb*, *c-ptc/ret*, N-ras és az IL-2 receptor gén voltak az alábbi szervekben: Thymus, csontvelő, nyirokcsomó, tüdő, vese, máj, lép. A nyirokcsomókra és a thymusra vonatkozó eredmények a 12-13. ábrákon láthatók. Mindkét szervben a 12. órától kezdődően megemelkedett az N-ras gén expressziója, és a thymusban ezzel párhuzamosan a *c-myc* is fokozott expressziót mutatott. Ezen kívül a 12 órás mérésnél emelkedett volt a nyirokcsomóban a *c-myc*, a thymusban pedig a *c-myb* gén expressziója. A többi vizsgált szerv közül a lépben találtunk még emelkedett expressziókat (*c-myb*, N-ras, *c-myc*, *c-ptc/ret*), illetve kisebb mértékben a májban (*c-myc* és *c-ptc/ret*) (194, 195).

Vizsgálatunkban megállapítottuk, hogy a ciklosporin több **protoonkogén expresszióját befolyásolja, már röviddel a kezelés után.** Ezért elképzelhető, hogy a másodlagos daganatok kialakulása nem csak az immunszuppresszív hatás következménye, hanem a ciklosporin közvetlenül a célsejtekre kifejtett hatásának is szerepe van benne. Ezt alátámasztja az is, hogy ismeretes a ciklosporin kezelés hatására kialakuló szekunder

hematológiai malignus folyamat (191), és az általunk vizsgált szervek közül éppen a nyirokcsomók illetve a thymus – valamint kisebb mértékben a lép – voltak érintettek. Ráadásul az emelkedett expressziót mutató onkogének mindegyike valamilyen formában involválódhat hematológiai betegségek előidézésében (196).



12. Ábra. Ciklosporin kezelés hatására bekövetkező génexpresszió-változások (nyirokcsomó)



13. Ábra. Ciklosporin kezelés hatására bekövetkező génexpresszió-változások (thymus)

Természetesen a korai géneexpressziós kísérleteknél felmerül a kérdés, hogy a kapott expresszió-változások mennyire tekinthetők specifikusnak, és mennyire alkalmasak a karcinogén hatás jelzésére. Mivel korai válaszokról van szó, amelyek egyes esetekben transziensnek bizonyultak, az **eredményeket inkább az expozíció, mint betegség oldaláról értelmezhetjük.** Ahhoz, hogy a daganatkialakulás kockázatának megítélésére alkalmazhassuk a géneexpresszió-változásokat, tisztázni kell, hogy csak átmeneti jellegűek-e, vagy hosszabb időn keresztül fennállnak (124). Vizsgálni kell továbbá, hogy azon gének expressziója emelkedik-e, amelyek overexpresszióját az adott daganatban már leírták. **Kétségtelen viszont, hogy a géneexpresszió-változások alkalmasnak bizonyultak karcinogén-expozíció korai biomarkereként való alkalmazásra. Nem várható, hogy az expozícióra vonatkozó, pontos, kvalitatív és kvantitatív következtetéseket tudjunk levonni az expresszió-változások alapján, de mindenképpen alkalmasak a karcinogén hatás jelzésére** (190, 195), "high-risk" populációk azonosítására (197), és a prevenció hatékonyságának monitorozására (198).

Mivel állatkísérletekben bebizonyosodott, hogy a karcinogén-expozíció géneexpresszió-változásokat okoz, **lehetővé vált a humán vizsgálatok megkezdése. 1992-ben az egri kórházban daganatos clustert figyeltek meg, amelynek lehetséges okai között felmerült az etilén-oxid expozíció** (199). Az etilén-oxidot gázsterilizálásra használták, és a gázsterilizáló nem megfelelő használata vagy hibája esetén a dolgozók jelentős etilén-oxid expozíciójával számolhatunk (200). Az etilén-oxid esetleges szerepét tisztázandó, az egri kórház dolgozóinál géneexpresszió-vizsgálatokat végeztünk etilén-oxid exponált és nem exponált kontroll csoportokban (20-20 fő). Az expozíció mérésére nem volt lehetőség, a kísérleti és kontroll csoportokat a munkakör és a munkavégzés helye alapján állítottuk össze. a géneexpresszió-vizsgálatokat perifériás vérből izolált limfocitákból származó nukleinsavakkal végeztük, *N-ras*, *p53* és *IL-2* receptor génpórbákkal hibridizálva. Eredményeink szerint az *N-ras*, és a *p53* gén expressziója tekintetében jelentős különbség volt az exponált és a nem exponált dolgozók között, míg az *IL-2* receptor génnél nem találtunk lényeges eltérést (197, 199). Az emelkedett *N-ras* és *p53* géneexpressziót mutató személyek száma az alábbi volt (XIX. táblázat):

	N-ras	p53*
Exponáltak	11	20
Nem exponáltak	7	2

*p<0.05

XIX. Táblázat. Emelkedett génexpressziót mutató személyek száma az etilén-oxiddal exponált és a kontroll csoportokban (n=20).

A p53 tekintetében statisztikailag is szignifikáns összefüggés azt mutatta, hogy az alkalmasan megválasztott génexpresszió-változások humán viszonylatban is használhatók potenciálisan karcinogén expozíciók jelzésére. A gyakorlati alkalmazást tekintve nem valószínű, hogy az ilyen típusú génexpresszió-vizsgálatok az expozíció pontos mérésére szolgáló markereket (pl. DNS-adduktokat) helyettesíthetnék, de elképzelhető, hogy a kumulatív expozíció és az egyéni érzékenység eredőjeként a csoportszintű kockázat becslésére alkalmazhatók lesznek. A genotoxicitást vizsgáló hagyományos tesztekkel szemben előnyük, hogy az epigenetikuss hatásokat is mérni képesek, illetve valószínűleg kisebb, finomabb eltéréseket is mérhetnek. Ezért alkalmasak például exponált dolgozók esetén az expozíció csökkentésére tett intézkedések hatékonyságának mérésére (198), vagyis a primér prevenció gyakorlatában használhatók.

A génexpresszió-változások akkor lehetnek a daganatkialakulás kockázatának valid biomarkeri, ha magában a daganatban is találunk emelkedett génexpressziókat, és ezeket kapcsolatba tudjuk hozni a korábban – még daganatmentes szervben – tapasztalt expresszió-változásokkal. A helyzetet nehezíti, hogy a daganatok szövettani szerkezete gyakran heterogén (201), és egyes genetikai jellemzőket – pl. pontmutációk előfordulását – csak a daganat bizonyos területein vagy a sejtek egy részében lehet kimutatni (202). Mivel az intratumorális genetikai heterogenitás kérdésével elsősorban pontmutációkkal, kromoszómaaberrációkkal kapcsolatban foglalkoztak, érdemes megvizsgálni, hogy a gén-overexpressziók milyen megoszlást mutatnak a daganaton belül. Az agytumороk különösen alkalmasak voltak erre

a vizsgálatra, egyrészt, mert – ellentétben számos más daganattal – az onkogének expressziójáról viszonylag kevés adat állt rendelkezésre (203, 204), másrészt pedig azért, mert a glioblastomáknál nem ritka a szövettani heterogenitás, az elkülönült “high-grade” és “low-grade” területek jelenléte a daganaton belül (205). Egyrészt tehát felvilágosítást kaphatunk az agytumorokban előforduló gén-overexpressziókról, másrészt pedig azokban az esetekben, ahol több minta vizsgálatára is lehetőség nyílik, az intratumorális heterogenitás kérdését is tanulmányozhatjuk. A vizsgálatához műtéti úton eltávolított agytumorokból – a DOTE Idegsebészeti Klinika anyagából – származó mintákat használtunk fel, amelyeket az RNS izolálás megkezdéséig –70 °C-on tartottunk (206, 207). Összesen 3 glioblastomából, 4 meningeomából, 1 astrocytomából, 1 neuroblastomából és 1 haemangioma cavernosumból származó mintákat dolgoztunk fel. 4 alkalommal a peritumorális, makroszkopikusan épnék tűnő szövetből is elvégeztük a vizsgálatot. Az izolált RNS-t az alábbi onkogén-panellel hibridizáltuk: *N-ras*, *H-ras*, *c-sis*, *c-myc*, *c-erbB2*, *c-ptc/ret*, *c-mos*, *c-myb*, *c-fos*. Eredményeinket az XX. táblázat tartalmazza. Elsősorban a *ras* gének és a *c-myc* gén mutatott overexpressziót a vizsgált daganatokban. Egyetlen esetben találtuk a *c-ptc/ret* gén overexpresszióját, egy meningeomában. Egy glioblastománál az *N-ras* onkogén overexpresszióját találtuk, mind a tumor belsejében, mind a felszínén, mind a tumor környéki makroszkóposan ép szövetben. A második glioblastománál a *H-ras* gén volt overexpresszált, a tumor melletti, épnék tűnő mintában is. A harmadik glioblastoma intratumorálisan *N-ras* és *c-myc* overexpressziót mutatott, míg a tumor környéki – morfológiailag ép – mintában a *H-ras* expressziója volt magas. A haemangiománál is vizsgáltuk a tumor melletti szövetet, ahol *c-myc* overexpressziót találtunk (magában a tumorban a *c-myc* és az *N-ras* gén volt overexpresszált). Említésre méltó még az egyik astrocytomában talált nagy intratumorális heterogenitás: A három minta egyikében az *N-ras* és a *c-myc*, a másikban a *H-ras* gén volt overexpresszált, míg a harmadik mintában nem volt emelkedett génexpresszió.

Ebben a vizsgálatban sikerült igazolni, hogy különböző agytumorokban a *H-ras*, *N-ras* és *c-myc* gén overexpresszált lehet. Beigazolódtott az is, hogy egyes tumorok intratumorális heterogenitást mutatnak az onkogén-overexpresszió tekintetében, a tumor belsejéből

származó mintákban is, de különösen, ha a tumor felszíni részét hasonlítjuk össze a tumor belsejével. Igazoltuk továbbá, hogy a tumor környékéről származó, makroszkopikusan ép szövetmintákban is onkogén-overexpresszió mérhető (207). Ennek a biológiai jelentőségét egyelőre nem tudjuk, de valószínű (főként, hogy kontroll szövetekben nem találtunk overexpressziót), hogy a daganat közelségével függ össze. Elképzelhető, hogy a daganatsejtekből a közvetlen környezetükbe kerülő metabolitok jelentenek proliferációs stimulusokat az itt található sejtek számára (208).

TUMOR	BIOPSZIA HELYE	ONKOGÉN- EXPRESSZIÓ
Haemangioma	Tumor környéki Intratumorális	<i>c-myc</i> <i>N-ras</i> , <i>c-myc</i>
Glioblastoma	Tumor környéki Intratumorális	<i>Ha-ras</i> <i>N-ras</i> , <i>c-myc</i>
Glioblastoma	Tumor felszíni Tumor környéki Intratumorális	<i>N-ras</i> <i>N-ras</i> <i>N-ras</i>
Glioblastoma	Tumor környéki Intratumorális	<i>Ha-ras</i> <i>Ha-ras</i>
Meningeoma	Tumor felszíni Intratumorális	<i>N-ras</i> , <i>c-myc</i> <i>N-ras</i>
Meningeoma	Intratumorális	<i>c-ptc/ret</i>
Meningeoma	Intratumorális	<i>Ha-ras</i>
Meningeoma	Intratumorális Intratumorális Intratumorális	<i>N-ras</i> , <i>c-myc</i> <i>Ha-ras</i> ---
Astrocytoma	Tumor felszíni Intratumorális	<i>N-ras</i> , <i>c-myc</i> ---
Neurofibroma	Intratumorális	---

XX. Táblázat. Onkogén-overexpresszió agytumороkban

VI.3. Génamplifikációk, mint prognosztikus markerek

Szerettük volna pontosabbá tenni a gyomorrák prognózisa és a *c-myc* amplifikáció közötti kapcsolatot, ezért gyomorrákos betegek tumormintáiból vizsgáltuk a *c-myc* amplifikáció meglétét, és ezt összevetettük különböző klinikai és szövettani paraméterekkel. 23 gyomorrákos beteg műtéti úton eltávolított daganatából származó, formalinnal fixált, paraffinba ágyazott mintáit vizsgáltuk (a DOTE Pathologiai Intézet anyagából), és elemeztük az amplifikációk jelenlétét a histopathologiai paraméterek függvényében.(209)

A betegek átlagéletkora 59.6 év volt (28-85), nemek szerinti megoszlásuk: 9 férfi és 14 nő. A vizsgált paraméterek az alábbiak voltak: Életkor, grádus, TNM stádium, Lauren-típus, lokalizáció, a beteg klinikai állapota. Összesen 6 tumorban találtunk amplifikációt, mértéke 2.12-szeres és 18.2-szeres között volt (átlagban 9.1). **Statistikailag szignifikáns korrelációt találtunk a távoli metasztázisok megléte és a *c-myc* amplifikáció mértéke között ($r=0.56$, $p<0.01$).** Ezen kívül még a tumor lokalizációja (a gyakorlatilag az egész gyomorra kiterjedő daganatok) és az amplifikáció jelenléte között kaptunk összefüggést. Ez utóbbi feltehetően azzal magyarázható, hogy a *c-myc* amplifikáció a gyomorrákok kialakulásának késői stádiumában következik be. A *myc* amplifikációk vonatkozásában eredményeink Ranzani és mtsai vizsgálatát támasztják alá, akik szintén úgy találták, hogy a *c-myc* gén amplifikációja növeli a gyomorrákok metasztatikus potenciálját (153).

Ezen eredményeink összhangban vannak a vastagbél-daganatos betegekben végzett hasonló vizsgálatunk adataival, ahol 20 esetet vizsgálva szintén korrelációt találtunk a távoli metasztázisok kialakulásával ($r=0.51$, $p<0.05$). Az amplifikáció itt a betegség súlyosságával is összefüggésben volt ($r=0.47$, $p<0.05$), megerősítve a hipotézist, miszerint a *c-myc* amplifikációt mutató daganatok malignusabb, agresszívebb fenotípusúak (210).

A gyomor-béltraktus daganatainál ritkábbak a húgyúti tumorok, ezért velük kapcsolatosan kevesebb közleményt találhatunk az irodalomban. A világossejtes veserákkal kapcsolatosan ismert, hogy a *c-myc* gén overexpressziója, valamint a *K-ras* gén aktivációja (pontmutáció) szerepet játszhat a betegség genezisében. A két gén amplifikációját sikerült igazolni fenotípusosan világossejtes veserákok mutató sejtvonalban (211), de *in vivo*

adatok nem álltak rendelkezésre. Mivel a két gén bizonyosan érintett lehet a vesetumor kialakulása során, úgy gondoltuk, célszerű megvizsgálni, hogy ez az érintettség megnyilvánulhat-e génamplifikáció formájában, és ha igen, akkor milyen hatással van a daganat prognózisára, klinikai, szövettani tulajdonságaira. (212)

Vizsgálatunkat 36 világszejtes veserákos betegből származó mintán végeztük (DOTE Pathologiai Intézet anyaga), átlagéletkoruk 58.3 év volt (40-79), nem szerinti megoszlásuk: 19 férfi és 17 nő. A *c-myc* gén amplifikációját 3 esetben sikerült kimutatni, átlagos mértéke 2.47-szeres volt. A *K-ras* esetében 6 mintában találtunk amplifikációt (átl. 2.93-szoros). A *c-myc* amplifikáció megléte vagy mértéke nem mutatott statisztikailag szignifikáns összefüggést a klinikopathologiai paraméterekkel, ami legelsősorban az alacsony esetszámnak tudható be. **A *K-ras* amplifikáció két paraméterrel mutatott szignifikáns korrelációt, a szövettani grádussal és a tumormérettel (XXI-XXII. táblázatok).** Nem volt szignifikáns összefüggés az életkorral, nemmel, TNM stádiummal, a tumor tömegével és az életminőséggel. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a *K-ras* gén amplifikációja a daganat progressziójával együttjáró genetikai történés. Ez összhangban van azokkal a vizsgálatokkal, amelyek más daganatokban a *K-ras* gén pontmutációját (169, 171, 172) a daganat progressziójának jeleként értékelték. Nem hagyhatjuk azonban figyelmen kívül, hogy az onkogén amplifikációk általában a daganatkialakulás későbbi stádiumában történnek, biológiai jelentőségük ezért sem lehet azonos a pontmutációkéval. Mindazonáltal a szövettani grádussal és a tumormérettel való szignifikáns kapcsolat felhívja a figyelmet a *K-ras* amplifikáció feltehető prognosztikus jelentőségére. A *K-ras* génre vonatkozó megfigyelés azért is érdekes, mert amplifikációja meglehetősen ritka jelenség, aktivációja tipikusan pontmutációk hatására szokott bekövetkezni. A *c-myc* génnel kapcsolatos eredmények felhívják a figyelmet a gén amplifikációjának lehetőségére világszejtes veserákban, és a további vizsgálatok szükségességét vetik fel.

	Grádus	Kollaráció koefficiens	Szignifikancia
Nincs amplifikáció (30 eset)	1.8 ± 0.6	0.43	p=0.017
K- <i>ras</i> -amplifikáció (6 eset)	2.2 ± 0.8		

XXI. Táblázat. K-*ras* amplifikáció és grádus összefüggése

	TUMORMÉRET (CM)	KOLLERÁCIÓS KOEFFICIENS	SZIGNIFIKANCIA
Nincs amplifikáció (30 eset)	8.0 ± 5.5	0.41	p=0.016
K- <i>ras</i> - amplifikáció (6 eset)	15.0 ± 5.8		

XXII. Táblázat. K-*ras* amplifikáció és tumorméret összefüggése

VII. Az elért új eredmények összefoglalása

1. Megvizsgáltuk a magyar népességből származó egészséges mintában előforduló allélek gyakoriságát a CYP2E1, CYP1A1, GSTM1, GSTT1, NAT2 metabolizáló enzimek és a p53 tumor szuppresszor gén allélpolimorfizmusaira vonatkozóan. Irodalmi adatokkal összehasonlítva úgy találtuk, hogy ezek hasonlóak más európai népekben talált allélgyakoriságokhoz. Ez arra utal, hogy a magas magyarországi daganatos halálozások hátterében nem elsősorban a daganatokra hajlamosító, „egyéni érzékenység” jellegű tényezőket kell keresnünk.
2. A CYP2E1, CYP1A1 és a GSTM1 metabolizáló enzimek allélgyakoriságait colorectalis daganatos betegekben és egészséges kontroll populációban vizsgálva önmagában csak a CYP2E1 polimorfizmus mutatott szignifikáns összefüggést a daganat kialakulásának kockázatával: a c2 allélt hordozók gyakrabban fordultak elő vastag- és végbéldaganatos betegek között, mint a kontroll csoportban. Ha a három polimorfizmust egyidejűleg vizsgáltuk, azaz a mindhárom „high-risk” allélt (CYP2E1 c2, CYP1A1 Ile, GSTM1 0) hordozó személyek kockázatát számítottuk ki, akkor ez lényegesen magasabb volt a kontrollokénál. Sikerült tehát a metabolizáló enzimek „high-risk” alléljai közötti kölcsönhatást igazolni, és bizonyítani, hogy az önmagukban esetleg még nem mérhető kockázatemelkedést okozó allélek együttes jelenléte a daganatkialakulás kockázatát szignifikánsan fokozza.
3. Vizsgáltuk a fenti három polimorfizmus hatását a daganatos betegekben, arra vonatkozóan, hogy bizonyos alléleket hordozók daganataiban gyakoribbak-e a K-ras onkogén pontmutációi. Úgy találtuk, hogy a CYP2E1 c2 allélt és a GSTM1 0 allélt hordozók (ezek a daganatkialakulás szempontjából is „high risk” allélek) daganataiban gyakrabban fordulnak elő K-ras pontmutációk. Vizsgáltuk továbbá a K-ras pontmutációk meglétének esetleges

összefüggését a daganat klinikopathologiai sajátosságaival. Úgy találtuk, hogy a Dukes B stádiumú betegeknél a K-ras pontmutáció megléte rosszabb prognózist indikál. Mivel saját vizsgálatunk és irodalmi adatok szerint is valószínű, hogy a K-ras pontmutáció jelenléte a vastag- és végbéldaganatok – vagy legalábbis bizonyos csoportjaik – rosszabb prognózisával jár együtt, feltételezhető, hogy a CYP2E1 c2 és/vagy a GSTM1 0 genotípusú colorectalis daganatos betegek prognózisa rosszabb, mint a „low-risk” alleleket hordozóké. Ez a hipotézis még további vizsgálatokat igényel.

4. Eset-kontroll vizsgálatban igazoltuk a NAT2 rapid acetilálók és a p53 tumor szuppresszor gén *Pro* alléljét hordozók fokozott vastag- és végbélrákos kockázatát. Ebben a vizsgálatban a GSTM1, GSTT1, CYP2E1 és CYP1A1 polimorfizmusok kockázatot befolyásoló hatása nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Ismét sikerült gén-gén kölcsönhatásokat kimutatni. Az egyidejűleg GSTM1 és NAT2, vagy GSTM1 és p53 „high-risk” genotípusok colorectalis daganatos kockázata mintegy háromszorosa, a NAT2 és p53 „high-risk” genotípusoké pedig négyszerese volt a kontroll populációénak.
5. A metabolizáló enzimek hatásának korai, molekuláris szintű végpontját vizsgálva úgy találtuk, hogy ezen allépolimorfizmusok befolyásolják a környezeti expozíció hatására bekövetkező DNS-károsodás mértékét. A DNS-károsodás mértékét székletből izolált, lesodródott bélnyálkahártya-sejtekben vizsgáltuk, expozícióként bőséges füstölt-sült hússokat tartalmazó étrendet alkalmaztunk, a metabolizáló enzimek közül pedig a GSTM1 és a NAT2 polimorfizmusát vizsgáltuk. Ez a „diéta” fokozta a bélnyálkahártya sejtekben Comet-assay-vel mérhető egyes lánctörések mértékét, de a növekedés a „low-risk” genotípusúakban nem volt statisztikailag szignifikáns. Mind a NAT2 rapid acetilálókban, mind a GSTM1 0 genotípusúakban („high-risk” allélek) azonban az expozíció szignifikánsan emelkedett mértékű DNS-károsodásokat indukált. A szignifikáns hatás kialakításához tehát a környezeti (jelentős sült-hús-fogyasztás) és a genetikai (NAT2 rapid acetiláló vagy GSTM1 0 genotípus) tényezők kölcsönhatása vezetett.

6. Génexpresszió-változásokat vizsgálva *in vivo* kísérletekben sikerült igazolni, hogy **karcinogén hatású vegyületekkel történő kezelés hatására kísérleti állatok különböző szerveiben már az első 24 órán belül egyes onkogének (N-ras, H-ras, c-myc) és gyakran a p53 tumor szuppresszor gén expressziója fokozódik.** Vizsgálataink szerint ezek az expresszió-változások mind a **genotoxikus (DMBA)** mind a **nem genotoxikus (ciklosporin)** hatású expozíció korai biomarkereiként alkalmazhatók.
7. **Humán agytumороkat vizsgálva sikerült igazolni, hogy ezen daganatokban a c-myc, az N-ras és a H-ras gén overexpresszált lehet,** illetve egy esetben a *c-ptc/ret* onkogén overexpresszióját találtuk. A tumorok különböző helyeiről vett mintákban többször is más-más onkogének overexpresszióját találtuk, ami a **daganatok heterogenitására utal.** Négy alkalommal a **tumor környéki makroszkopikusan ép szövetben is fokozott onkogén-expressziót találtunk.** Ennek jelentősége nem tisztázott, lehetséges, hogy a daganat által kiváltott reaktív emelkedésről van szó, de elképzelhető, hogy szerepe van a daganat progressziójában.
8. Etilén-oxid-exponált személyekben igazoltuk a génexpresszió-változások humán alkalmazhatóságát, mint a karcinogén-expozíció monitorozásának biomarkereit. **Etilén-oxid expozíciónak kitett személyek fehérvérsejtjeiben szignifikánsan gyakrabban találtunk N-ras illetve p53 overexpressziót, mint a kontroll, nem exponált csoportban.**
9. Az onkogén-amplifikációk szerepét vizsgálva úgy találtuk, hogy a **K-ras onkogén-amplifikáció világossejtes veserákban szignifikáns kapcsolatot mutat a daganat méretével és szövettani grádusával,** tehát elképzelhető prognosztikus markerként való alkalmazása. Ugyancsak világossejtes veserákból sikerült *c-myc* amplifikációt kimutatni, de ezt az alacsony esetszám miatt nem tudtuk pontosan elemezni. **Gyomorrákokban szintén a c-myc gén amplifikációját sikerült igazolni, és megerősítettük azt a korábbi feltételezést, miszerint ez a daganat rosszabb prognózisának jele. Colorectalis daganatokban a c-my amplifikáció gyakoribb volt a távoli metasztázist adó esetekben.**

VIII. Irodalom

1. Perera FP., Weinstein IB.: Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection: new approaches to studies of human cancer causation. *J. Chron. Dis.* 35: 581-600. 1982.
2. Perera FP., Weinstein IB.: Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis.* 21: 517-524. 2000.
3. Nielsen PS., Andreassen A., Farmer PB., Ovrebo S., Autrup H.: Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers. DNA and hemoglobin adducts and urinary 1 hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol. Lett.* 86: 27-37. 1996.
4. Fabianova E., Szeszenia Dabrowska N., Kjaerheim K., Boffetta P.: Occupational cancer in central European countries. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl 2: 279-282. 1999.
5. Edler L., Kopp Schneider A.: Statistical models for low dose exposure. *Mutat. Res.* 405: 227-236. 1998.
6. Undeger U., Zorlu AF., Basaran N.: Use of the alkaline comet assay to monitor DNA damage in technicians exposed to low dose radiation. *J. Occup. Environ. Med.* 41: 693-698. 1999.
7. Fiche M., Avet Loiseau H., Heymann MF., Moussaly F., Digabel C., Joubert M., Classe JM., Dravet F., Fumoleau P., Ross J., Maugard CM.: Genetic alterations in early onset invasive breast carcinomas: correlation of c erbB 2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *Int. J. Cancer.* 84: 511-515. 1999.
8. Kersemaekers AM., Fleuren GJ., Kenter GG., Van den Broek LJ., Uljee SM., Hermans J., Van de Vijver MJ.: Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* 5: 577-586. 1999.
9. Goh HS., Elnatan J., Low CH., Smith DR.: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location. *Int. J. Oncol.* 15: 491-498. 1999.

10. Amos CI., Xu W., Spitz MR.: Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res.* 151: 3-12. 1999.
11. Shepel LA., Gould MN.: The genetic components of susceptibility to breast cancer in the rat. *Prog. Exp. Tumor Res.* 35: 158-169. 1999.
12. Levi F.: Cancer prevention: Epidemiology and perspectives. *Eur. J. Cancer.* 35: 1046-1058. 1999.
13. Lohmann DR.: RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum. Mutat.* 14: 283-288. 1999.
14. Mann GB., Borgen PI.: Breast cancer genes and the surgeon. *J. Surg. Oncol.* 67: 267-274. 1998.
15. Lynch HT., Watson P., Shaw TG., Lynch JF., Harty AE., Franklin BA., Kapler CR., Tinley ST., Liu B.: Clinical impact of molecular genetic diagnosis counseling, and management of hereditary cancer: part I: studies of cancer in families. *Cancer.* 86 (8 Suppl): 1629-1636. 1999.
16. Kleihues P., Aguzzi A., Ohgaki H.: Genetic and environmental factors in the etiology of human brain tumors. *Toxicol. Lett.* 82: 601 605. 1995.
17. Caporaso N.: Selection of candidategenes for population studies. In: *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer.* Eds.: Vineis P., Malats N., Lang M., d'Errico A., Caporaso N., Cuzick J., Boffetta P.: IARC Sci. Publ. No. 148. Lyon, France. pp: 23-36. 1999.
18. Rothman N., Hayes RB.: Using biomarkers of genetic susceptibility to enhance the study of cancer etiology. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 8: 291-295. 1995.
19. Potzsch J., Schramm T.: Role of environmental factors in cancer etiology. *Arch. Geschwulstforsch.* 60: 235-239. 1990.
20. Meyer UA.: Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24: 449-459. 1996.
21. Taningher M., Malacarne D., Izzotti A., Ugolini D., Parodi S.: Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res.* 436: 227-261. 1999.
22. Gonzalez FJ., Skoda RC., Kimura S., Umeno M., Zanger UM., Nebert DW., Gelboin HV., Hardwick LP., Meyer UA.: Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature.* 331: 442-446. 1988.

23. Ketterer B., Taylor J., Meyer D., Pemble S., Coles B., ChuLin X., Spencer S.: Some function of glutathione transferases. In: Tew K., Mannervik B., Mantle TJ, Pickett CB, Hayes JD, eds, Structure and Function of Glutathione Transferases. Boca Raton, Florida, CRC Press, 15-27. 1993.
24. Schröder KR., Wibel FA., Reich S., Dannappel D., Bolt HM., Hallier E.: Glutathione S-transferase (GST) theta polymorphism influences background SCE rate. Arch. Toxicol. 69: 505-507. 1995.
25. Zimniak P., Nanduri B., Pikula S., Bandorowicz-Pikula J., Singhal SS., Srivastava SK., Awasthi S., Awasthi YC.: Naturally-occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymatic properties. Eur. J. Biochem. 244: 893-899. 1994.
26. Strange RC., Faulder CG., Davis BA., Brown JAH., Hopkinson DA., Cotton W.: The human glutathione S-transferases: studies on the tissue distribution and genetic variation of the GST1, GST2 and GST3 isoenzymes. Ann. Hum. Genet. 48: 11-20. 1984.
27. Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Anttila S., Vainio H.: The GSTM1 null genotype as a potential modifier for squamous cell carcinoma of the lung. Carcinogenesis. 14: 1479-1481. 1993.
28. Board PG.: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. Am. J. Hum. Genet. 33: 36-43. 1981.
29. Seidegard J., Vorachek WR., Pero RW., Pearson WR.: Hereditary differences in the expression of the human glutathione S-transferase activity on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 7293-7297. 1988.
30. Nakachi K., Imai K., Hayashi S., Kawajiri K.: Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in Japanese population. Cancer Res. 53: 2994-2999. 1993.
31. Deakin M., Elder J., Hendrickse C., Peckham D., Baldwin D., Pantin C., Wild N., Leopard P., Bell DA., Jones P., Duncan H., Brannigan K., Alldersea J., Fryer AA., Strange RC.: Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with

- GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*. 17: 881-884. 1996.
32. Kelsey KT., Spitz MR., Zuo ZF., Wiencke JK.: Polymorphisms in the glutathione S transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer Causes Control*. 8: 554-559. 1997.
 33. Alexandrie A.-K., Ingelman Sundberg M., Seidegard J., Tornling G., Rannug A.: In: Proceedings of the International ISSX Workshop on Glutathione S-transferases. London, Taylor and Francis. 1995.
 34. Zhong S., Wyllie AH., Barnes D., Wolf CR., Spurr NK.: Relationship between GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*. 14: 1821-1824. 1993.
 35. Brockmüller J., Kerb R., Drakoulis N., Staffeldt B., Roots I.: Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. *Cancer Res*. 54: 4103-4111. 1994.
 36. Lin HJ., Han CY., Bernstein DA., Hsiao W., Lin BK., Hardy S.: Ethnic distribution of the glutathione S-transferase mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 15: 1077-1081. 1994.
 37. Gawronska Szklarz B., Lubinski J., Kladny J., Kurzawski G., Bielicki D., Wojcicki M., Sych Z., Musial HD.: Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. *Exp. Toxicol. Pathol*. 51: 321-325. 1999.
 38. Welfare M., Monesola Adeokun A., Bassendine MF., Daly AK.: Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 8: 289-292. 1999.
 39. Katoh T., Nagata N., Kuroda Y., Itoh H., Kawahara A., Kuroki N., Ookuma R., Bell DA.: Glutathione S transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 17: 1855-1859. 1996.
 40. Kampman E., Slattery ML., Bigler J., Leppert M., Samowitz W., Caan BJ., Potter JD.: Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 8: 15-24. 1999.

41. Slattery ML., Potter JD., Ma KN., Caan BJ., Leppert M., Samowitz W.: Western diet, family history of colorectal cancer, NAT2, GSTM 1 and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control.* 11: 1-8. 2000.
42. Lin HJ., Probst Hensch NM., Louie AD., Kau IH., Witte JS., Ingles SA., Frankl HD., Lee ER., Haile RW.: Glutathione transferase null genotype, broccoli, and lower prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 647-652. 1998.
43. Heagerty AHM., Fitzgerald D., Smith A., Bowers B., Jones P., Fryer AA., Zhao L., Alldersea J., Strange RC.: Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous malignancy. *Lancet.* 343: 266-268. 1994.
44. Hall AG., Autzen P., Cattan AR., Malcolm AJ., Cole M., Kernahan J., Reid MM.: Expression of mu class glutathione S-transferase correlates with event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer Res.* 54: 5251-5254. 1994.
45. de Bruin WCC., Wagenmans MJM., Board PG., Peters WHM.: Expression of glutathione S-transferase θ class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers. *Carcinogenesis.* 20: 1453-1457. 1999.
46. Gertig DM., Stampfer M., Hairman CH., et al.: Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 7: 1001-1005. 1998.
47. Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y.: *Cytochrome P-450*. Second edition. Tokyo, Kodansha, 1993.
48. Guengerich FP., Shimada T.: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 391-407. 1991.
49. Kawajiri K., Fujii-Kuriyama Y.: P450 and human cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 1325-1335. 1991.
50. Hildebrandt CE., Gonzalez FJ., McBride OW., Nebert DW.: Assignment of the human 2, 4, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 gene to chromosome 15. *Nucleic Acids Res.* 13: 2009-2016. 1985.

51. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K., Watanabe J., Hayashi S.: Germ line polymorphisms of *p53* and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis*. 14: 1085-1089. 1993.
52. Crofts F., Cosma GN., Currie D., Taioli E., Toniolo P., Garte S.: A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis*. 14: 1729-1731. 1993.
53. Hayashi S-I., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K.: Genetic linkage of lung cancer-associated *Msp* I. Polymorphism with amino acid replacement in the haeme binding region of the cytochrome P450 IAI gene. *J. Biochem*. 110: 407-411. 1991.
54. Drakoulis ND., Cascorbi I., Brockmöller CR., Roots GI.: Polymorphism in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin. Investig.* 72: 240-248. 1994.
55. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K., Watanabe J., Hayashi S.-I.: The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 14: 77-87. 1993.
56. Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Kavjalainen A., Anttila S., Vainio H.: Point-mutational *Msp* I and *Ile-Val* polymorphism closely linked in the CYP1A1 gene: Lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1: 485-489. 1992.
57. Sato M., Sato T., Izumo T., Amagasa T.: Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*. 20: 1927-1931. 1999.
58. Katoh T., Kaneko S., Kohshi K., Munaka M., Kitagawa K., Kunugita N., Ikemura K., Kawamoto T.: Genetic polymorphisms of tobacco and alcohol related metabolizing enzymes and oral cavity cancer. *Int. J. Cancer*. 83: 606-609. 1999.
59. Matthias C., Bockmuhl U., Jahnke V., Jones PW., Hayes JD., Alldersea J., Gilford J., Bailey L., Bath J., Worrall SF., Hand P., Fryer AA., Strange RC.: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics*. 8: 91-100. 1998.

60. Huang CS., Chern HD., Chang KJ., Cheng CW., Hsu SM., Shen CY.: Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res.* 59: 4870-4875. 1999.
61. Bailey LR., Roodi N., Verrier CS., Yee CJ., Dupont WD., Parl FF.: Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer Res.* 58: 65-70. 1998.
62. Sivaraman L., Leatham MP., Yee J., Wilkens LR., Lau AF., Le Marchand L.: CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54: 3692-3695. 1994.
63. Lee HC., Yoon YB., Kim CY.: Association between genetic polymorphisms of the cytochromes P 450 (1A1, 2D6, and 2E1) and the susceptibility to pancreatic cancer. *Korean J. Intern. Med.* 12: 128-136. 1997.
64. Umeno M., McBride OW., Yang CS., et al.: Human ethanol-inducible P450III_{E1}: Complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry.* 27: 9006-9013. 1988.
65. Subramanian U., Ahmed AE.: Intestinal toxicity of acrylonitrile: In vitro metabolism by intestinal cytochrome P4502E1. *Tox. Appl. Pharmacol.* 135: 1-8. 1995.
66. Lin DX., Tang YM., Peng Q., Lu SX., Ambrosone CB., Kadlubar FF.: Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S transferases T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 1013-1018. 1998.
67. Iwahashi K., Ameno S., Ameno K., Okada N., Kinoshita H., Sakae Y., Nakamura K., Watanabe M., Ijiri I., Harada S.: Relationship between alcoholism and CYP2E1 C/D polymorphism. *Neuropsychobiology.* 38: 218-221. 1998.
68. Parsian A., Cloninger CR., Zhang ZH.: Association studies of polymorphisms of CYP2E1 gene in alcoholics with cirrhosis, antisocial personality, and normal controls. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22: 888-891. 1998.

69. Uematsu F., Kikuchi H., Ohmachi T., Sagami I., Motomiya M., Kamataki T., Komori M., Watanabe M.: Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucleic Acid Res.* 19: 2803. 1991.
70. Persson I., Johansson I., Bergling H., Dahl ML., Seidegard J., Rylander R., Rannug A., Hogberg J., Sundberg MI.: Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.* 319: 207-211. 1993.
71. Uematsu F., Ikawa S., Kikuchi H., Sagami I., Kanamaru R., Abe T., Satoh K., Motomiya M., Watanabe M.: Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relation to low smoking exposure. *Pharmacogenetics.* 4: 58-63. 1994.
72. Hildesheim A., Anderson L., Chen C.-J., Cheng Y.-J., Brinton L.A., Daly AK., Reed CD., Chen J.-H., Caporaso NE., Hsu M.-M., Chen J.-Y., Idle JR., Hoover RN., Yang C.-S., Chhabra SK.: CYP2E1 genetic polymorphism and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer. Inst.* 89: 1207-1212. 1997.
73. Uematsu F., Kikuchi H., Motomiya M., Abe T., Sagami I., Ohmachi T., Wakui A., Kanamaru R., Watanabe M.: Associated between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 254-256. 1991.
74. Uematsu F., Kikuchi H., Abe T., Motomiya M., Ohmachi T., Sagami I., Watanabe M.: *MspI* polymorphism of the human CYP2E gene. *Nucleic Acid Res.* 19: 5797. 1991.
75. McBride OW., Umeno M., Gelboin HV., Gonzalez FJ.: A Taq I polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYPZE) *Nucleic Acid Res.* 15: 10071. 1987.
76. Hirvonen A., Husgafvel-Pursiainen K., Antilla S., Kavjalainen A., Vainio H.: The human CYP2E1 gene and lung cancer: *Dra I* and *Rsa I* restriction fragment length polymorphism in a Finnish study population. *Carcinogenesis.* 14: 85-88. 1993.
77. Oyama T., Kawamoto T., Mizoue T., Sugio K., Fodama Y., Mitsusomi T., Uasumoto K.: Cytochrom P450 2E1 polymorphism as a risk factor for lung cancer: in relation to *p53* gene mutation. *Anticancer Res.* 17: 583-587. 1997.

78. Watanabe J., Hayashi S., Nakachi K., Imai K., Suda Y., Sekine T., Kawajiri K.: *PstI* and *RsaI* RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 7194. 1990.
79. Hung HC., Chuang J., Chien YC., Chern HD., Chiang CP., Kuo YS., Hildesheim A., Chen CJ.: Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1., environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6: 901-915. 1997.
80. Farker K., Lehmann MH., Kastner R., Hoffmann A., Janitzky V., Schubert J., Matz U., Hofmann W.: CYP2E1 genotyping in renal cell/urothelial cancer patients in comparison with control populations. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 36: 463-468. 1998.
81. Brockmüller J., Cascorbi I., Kerb R., Roots I.: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N acetyltransferase 2, glutathione S transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* 56: 3915-3925. 1996.
82. Wu X., Amos CI., Kemp BL., Shi H., Jiang H., Wan Y., Spitz MR.: Cytochrome P450 2E1 Dral polymorphisms in lung cancer in minority populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 13-18. 1998.
83. Hamada GS., Sugimura H., Suzuki I., Nagura K., Kiyokawa E., Iwase T., Tanaka M., Takahashi T., Watanabe S., Kino I., et al.: The heme binding region polymorphism of cytochrome P450IA1 (CypIA1), rather than the *RsaI* polymorphism of IIE1 (CypIIE1), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4: 63-67. 1995.
84. Evans DA.: N acetyltransferase. In: Kalow W. ed *Pharmacogenetics of Drug Metabolism.* New York, Pergamon Press. 95 178. 1992.
85. Butler MA., Lang NP., Young JF., Caporaso NE., Vineis P., Hayes RB., Teitel CH., Massengill JP., Lawsen MF., Kadlubar FF.: Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics.* 2: 116-127. 1992.
86. Kadlubar FF., Butler MA., Kaderlik KR., Chou HC., Lang NP.: Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 98: 69-74. 1992.
87. Potter JD., Bigler J., Fosdick L., Bostick RM., Kampman E., Chen C., Louis TA., Grambsch P.: Colorectal adenomatous and hyperplastic

- polyps: smoking and N acetyltransferase 2 polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8: 69-75. 1999.
88. Le Marchand L., Sivaraman L., Franke AA., Custer LJ., Wilkens LR., Lau AF., Cooney RV.: Predictors of N-Acetyltransferase activity: Should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies? *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 5: 449-455. 1996.
89. Lower GM Jr., Nilsson T., Nelson CE., Wolf H., Gamsky TE., Bryan GT: N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ Health Perspect* 29: 71 9 1979.
90. Risch A., Wallace DM., Bathers S., Sim E.: Slow N acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 4: 231-236. 1995.
91. Slattery ML., Potter JD., Samowitz W., Bigler J., Caan B., Leppert M.: NAT2, GSTM 1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 1079-1084. 1998.
92. Gil JP., Lechner MC.: Increased frequency of wild type arylamine N acetyltransferase allele NAT2*4 homozygotes in Portuguese patients with colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 19: 37-41. 1998.
93. Huang CS., Chern HD., Shen CY., Hsu SM., Chang KJ.: Association between N acetyltransferase 2 (NAT2) genetic polymorphism and development of breast cancer in post menopausal Chinese women in Taiwan, an area of great increase in breast cancer incidence. *Int. J. Cancer.* 82: 175-179. 1999.
94. Gertig DM., Hankinson SE., Hough H., Spiegelman D., Colditz GA., Willett WC., Kelsey KT., Hunter DJ.: N-acetyl-transferase 2 genotypes, meat intake and breast cancer risk. *Int. J. Cancer.* 80: 13-17. 1999.
95. Ambrosone CB., Freudenheim JL., Sinha R., Graham S., Marshall JR., Vena JE., Laughlin R., Nemoto T., Shields PG.: Breast cancer risk, meat consumption and N acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphisms. *Int. J. Cancer.* 75: 825-830. 1998.
96. Bouchardy C., Mitrinen K., Wikman H., Husgafvel Pursiainen K., Dayer P., Benhamou S., Hirvonen A.: N acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes and lung cancer risk. *Pharmacogenetics.* 8: 291-298. 1998.

97. Nyberg F., Hou SM., Hemminki K., Lambert B., Pershagen G.: Glutathione S transferase mu1 and N acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and exposure to tobacco smoke in nonsmoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 875-883. 1998.
98. Prives C., Hall PA.: The p53 pathway. *J. Pathol.* 187: 112-126. 1999.
99. Hainaut P., Hollstein M.: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* 77: 81-137. 2000.
100. Sjalander A., Birgander R., Kivela A., Beckman G.: p53 polymorphisms and haplotypes in different ethnic groups. *Hum. Hered.* 45: 144-149. 1995.
101. Beckman G., Birgander R., Sjalander A., Saha N., Holmberg PA., Kivela A., Beckman L.: Is p53 polymorphism Maintained by Natural Selection? *Hum. Hered.* 44: 266-270. 1994.
102. Jin X., Wu X., Roth JA., Amos CI., King TM., Branch C., Honn SE., Spitz MR.: Higher lung cancer risk for younger African Americans with the Pro/Pro p53 genotype. *Carcinogenesis.* 16: 2205-2208. 1995.
103. Weston A., Godbold JH.: Polymorphisms of H ras 1 and p53 in breast cancer and lung cancer: a meta analysis. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 4: 919-926. 1997.
104. Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F., Breuer J., Leigh IM., Matlashewski G., Banks L.: Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 398: 229-234. 1998.
105. Yamashita T., Yaginuma Y., Saitoh Y., Kawai K., Kurakane T., Hayashi H., Ishikawa M.: Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis.* 20: 1733-1736. 1999.
106. Klaes R., Ridder R., Schaefer U., Benner A., von Knebel Doeberitz M.: No evidence of p53 allele specific predisposition in human papillomavirus associated cervical cancer. *J. Mol. Med.* 77: 299-302. 1999.

107. Sjalander A., Birgander R., Hallmans G., Cajander S., Lenner P., Athlin L., Beckman G., Beckman L.: *p53* polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*. 17: 1313-1316. 1996.
108. Buller RE., Sood A., Fullenkamp C., Sorosky J., Powills K., Anderson B.: The influence of the *p53* codon 72 polymorphism on ovarian carcinogenesis and prognosis. *Cancer Gene Ther.* 4: 239-245. 1997.
109. Wu WJ., Kakehi Y., Habuchi T., Kinoshita H., Ogawa O., Terachi T., Huang CH., Chiang CP., Yoshida O.: Allelic frequency of *p53* gene codon 72 polymorphism in urologic cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* 86: 730-736. 1995.
110. Sjalander A., Birgander R., Athlin L., Stenling R., Rutegard J., Beckman L., Beckman G.: *P53* germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 16: 1461-1464. 1995.
111. Ember I., Kiss I., Sándor J.: A daganatok epidemiológiája és prevenciója. Dialóg Campus Kiadó, 2000.
112. Demográfiai évkönyv 1998. Központi Statisztikai Hivatal. Budapest. 1999.
113. Wilmlink AB.: Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum.* 40: 483-493. 1997.
114. Ketterer B.: Dietary isothiocyanates as confounding factors in the molecular epidemiology of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 645-646. 1998.
115. Smalley W., Ray WA., Daugherty J., Griffin MR.: Use of nonsteroidal anti inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population based study. *Arch. Intern. Med.* 159: 161-166. 1999.
116. Lynch HT., Lemon SJ., Karr B., Franklin B., Lynch JF., Watson P., Tinley S., Lerman C., Carter C.: Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention.* 6: 987-991. 1997.
117. Fearon ER., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61: 759-776. 1990.
118. Trent JM.: Genetic basis of cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2: 134-137. 1990.

119. Breivik J., Meling GL., Spurkland A., Rognum TO., Gaudernack G.: K-*ras* mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br. J. Cancer.* 69: 367-371. 1994.
120. Haugen DR., Lillehaug JR., Akslen LA.: Enhanced expression of EGF receptor and low frequency of ras mutations in X ray induced rat thyroid tumours. *Virchows Arch.* 435: 434-441. 1999.
121. Tao L., Ge R., Xie M., Kramer PM., Pereira MA.: Effect of trichloroethylene on DNA methylation and expression of early-intermediate protooncogenes in the liver of B6C3F1 mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13: 231-237. 1999.
122. Hong SW., Park C.: The effect of aflatoxin B1 on the expression of early response genes and transforming growth factor-alpha in CCl4 induced rat liver injury. *Yonsei Med. J.* 38: 167-177. 1997.
123. Goldsworthy TL., Goldsworthy SM., Sprankle CS., Butterworth BE.: Expression of *myc*, *fos* and *Ha-ras* associated with chemically induced cell proliferation in the rat liver. *Cell Prolif.* 27: 269-278. 1994.
124. Ember I., Kiss I., Raposa T., Nowrasteh G., Matolcsy A.: In vivo effects of CHOP protocol on onco and suppressor gene expression in a "follow up study". *In vivo.* 12: 489-494. 1998.
125. Luscher B., Larsson LG.: The basic region/helix loop helix/leucine zipper domain of Myc proto oncoproteins: function and regulation. *Oncogene.* 18: 2955-2966. 1999.
126. Bai L., Sun Y., Li S.: Relationship of *p53* alteration and *myc* family gene overexpression with the clinical characteristics of lung cancer. *Chin. Med. J. Engl.* 110: 250-254. 1997.
127. Smith DR., Goh HS.: Overexpression of the *c-myc* proto oncogene in colorectal carcinoma is associated with a reduced mortality that is abrogated by point mutation of the *p53* tumor suppressor gene. *Clin. Cancer Res.* 2: 1049-1053. 1996.
128. Wu B., Wang M., You W., Yang S.: Overexpression of *c-myc* gene without gene amplification in human hepatocellular carcinoma. *Chin. Med. J. Engl.* 109: 922-925. 1996.
129. Loberg LI., Gauger JR., Buthod JL., Engdahl WR., McCormick DL.: Gene expression in human breast epithelial cells exposed to 60 Hz magnetic fields. *Carcinogenesis.* 20: 1633-1636. 1999.

130. Blattner C., Tobiasch E., Liffen M., Rahmsdorf HJ., Herrlich P.: DNA damage induced *p53* stabilization: no indication for an involvement of *p53* phosphorylation. *Oncogene*. 18: 1723-1732. 1999.
131. Freedman DA., Wu L., Levine AJ.: Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol. Life. Sci.* 55: 96-107. 1999.
132. Kuczyk M., Serth J., Bokemeyer C., Machtens S., Schwede J., Herrmann R., Paeslack U., Truss MC., Knuchel R., Jonas U.: The need for microdissectional tumor cell preparation during the molecular genetic analysis of prostate cancer. *World J. Urol.* 17: 115-122. 1999.
133. Liu Y., Kulesz Martin MF.: Altered gene expression in a clonal epidermal cell model of carcinogenesis identified by RNA differential display. *Carcinogenesis*. 19: 683-686. 1998.
134. Bu SZ., Yin DL., Ren XH., Jiang LZ., Wu ZJ., Gao QR., Pei G.: Progesterone induces apoptosis and up regulation of *p53* expression in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer*. 79: 1944-1950. 1997.
135. Hou X., Li JJ., Chen W., Li SA.: Estrogen induced proto oncogene and suppressor gene expression in the hamster kidney: significance for estrogen carcinogenesis. *Cancer Res.* 56: 2616-2620. 1996.
136. Rochlitz CF., Heide I., Thiede C., Herrmann R., de Kant E.: Evidence for a mutual regulation of *p53* and *c-myc* expression in human colorectal cancer metastases. *Ann. Oncol.* 6: 981-986. 1995.
137. Solanas M., Escrich E.: Ha-*ras* in normal and tumoral tissues: structure, function and regulation. *Rev. Esp. Fisiol.* 52: 173-192. 1996.
138. Ezzat S., Zheng L., Kolenda J., Safarian A., Freeman JL., Asa SL.: Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid*. 6: 409-416. 1996.
139. Paterson IC., Eveson JW., Prime SS.: Molecular changes in oral cancer may reflect aetiology and ethnic origin. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 32B: 150-153. 1996.
140. Nicolaides A., Huang YQ., Li JJ., Zhang WG., Friedman Kien AE.: Gene amplification and multiple mutations of the K-*ras* oncogene in Kaposi's sarcoma. *Anticancer Res.* 14(3A): 921-926. 1994.
141. Pierceall WE., Goldberg LH., Tainsky MA., Mukhopadhyay T., Ananthaswamy HN.: Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol. Carcinogenesis*. 4: 196-202. 1991.

142. Okuno M., Tanaka T., Komaki C., Nagase S., Shiratori Y., Muto Y., Kajiwara K., Maki T., Moriwaki H.: Suppressive effect of low amounts of safflower and perilla oils on diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer.* 30: 186-193. 1998.
143. Phillips JL., Haggren W., Thomas WJ., Ishida Jones T., Adey WR.: Effect of 72 Hz pulsed magnetic field exposure on ras p21 expression in CCRF CEM cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 13: 187-193. 1993.
144. Sadhu DN., Ramos K.: Modulation by retinoic acid of spontaneous and benzo(a)pyrene induced c-Ha-*ras* expression. *Basic Life Sci.* 61: 263-268. 1993.
145. Machotka SV., Garrett CT., Schwartz AM., Callahan R.: Amplification of the proto oncogenes int 2, c erb B 2 and c myc in human breast cancer. *Clin. Chim. Acta.* 184: 207-217. 1989.
146. Hasan Z., Inoue A., Ikeda H., Kamii Y., Obana K., Yokomori K., Tsuchida Y., Hemmi H., Shimatake H.: Competitive polymerase chain reaction for the determination of N myc amplification in neuroblastoma: report of clinical cases. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 9: 138-141. 1999.
147. Abou-Elella A., Gramlich T., Fritsch C., Gansler T.: c myc amplification in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable prognosis. *Mol. Pathol.* 9: 95-98. 1996.
148. Bandyopadhyay D., Redkar A., Bharde S., Dani H., Sampat M., Mitra I.: Prognostic association of c erbB 2 oncogene amplification and protein overexpression in human breast cancer using archival tissues. A comparative study. *Acta Oncol.* 33: 493-498. 1994.
149. Masramon L., Arribas R., Tortola S., Perucho M., Peinado MA.: Moderate amplifications of the c myc gene correlate with molecular and clinicopathological parameters in colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 77: 2349-2356. 1998.
150. Rochlitz CF., Herrmann R., de Kant E.: Overexpression and amplification of c myc during progression of human colorectal cancer. *Oncology.* 53: 448-454. 1996.
151. Suzuki S., Tenjin T., Watanabe H., Matsushima S., Shibuya T., Tanaka S.: Low level c-*myc* gene amplification in gastric cancer detected by dual

- color fluorescence in situ hybridization analysis. *J. Surg. Oncol.* 66: 173-178. 1997.
152. Amadori D., Maltoni M., Volpi A., Nanni O., Scarpi E., Renault B., Pellegata NS., Gaudio M., Magni E., Ranzani GN.: Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma. *Cancer.* 79: 226-232. 1997.
153. Ranzani GN., Pellegata NS., Revidere C., Saragoni A., Vio A., Maltoni M., Amadori D.: Heterogenous protooncogene amplification correlates with tumor progression and presence of metastasis in gastric cancer patients. *Cancer Res.* 50: 7811-7814. 1990.
154. Chomczynski P., Sacchi N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159. 1987.
155. Sundaresan V., Ganly P., Hasleton P., Bleehen NM., Rabbitts P.: Paraffin wax embedded material as a source of DNA for detection of somatic genetic changes. *Journal of Pathology.* 169: 43-52. 1993.
156. Blin N., Stafford DW.: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acids. Res.* 3: 2303 8. 1976.
157. Grieco M., Santro M., Melillo RM., Berlingueri MT., Ember I., Donghi R., Pierotti MA., Della-Porte G., Vecchio G.: "Activation of cellular oncogenes in human thyroid carcinomas. In: *Molecular Pathology of Gene Expression.* Eds.: Frati L., Aaronson SA., pp. 201-206. Raven Press, New York, 1989.
158. Breslow NE., Day NE.: *Statistical Methods in Cancer Research.* Vol. I, The Analysis of Case Control Studies, (IARC Scientific Publications No. 32), Lyon, IARC 1987
159. Maezawa Y., Yamauchi M., Toda G.: Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450III_{E1} gene and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* 89: 561-565. 1994.
160. Pool-Zobel BL., Bub A., Liegibel UM., Treptow van Lishaut S., Rechkemmer G.: Mechanism by wich vegetable consumption reduces genetic damage in humans. *Cancer Epid. Biom. Prev.* 7: 891 899. 1998.
161. Murata M., Tagawa M., Kimura M., Kimura H., Watanabe S., Saisho H.: Analysis of a germ line polymorphism of the *p53* gene in lung cancer

- patients; discrete results with smoking history. *Carcinogenesis*. 17: 261-264. 1996.
162. Okkels H., Sigsgaard T., Wolf H., Autrup H.: Arylamine N-Acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) polymorphisms in susceptibility to bladder cancer: The influence of smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6: 225-231. 1997.
163. Ichii S., Takeda S., Horii A., Nakatsuru S., Miyoshi Y., Emi M., Fujiwara Y., Koyama K., Furuyama J., Utsunomiya J., Nakamura Y.: Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene*. 8: 2399-2405. 1993.
164. Singh NP., McCoy MT., Tice RR., Schneider EL.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191. 1988.
165. Bauer E., Recknagel RD., Fiedler U., Wollweber L., Bock C., Greulich KO.: The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat Res.* 398: 101-110. 1998.
166. Davidson LA., Jiang Y-H., Derr JN., Aukema HM., Lupton JR., Chapkin RS.: Protein kinase C isoforms in human and rat colonic mucosa. *Archives of Biochem. Biophysics*. 312: 547-553. 1994.
167. Kiss I., Sándor J., Pajkos G., Bogner B., Ember I.: Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Research*. 20: 519-522. 2000.
168. Pajkos G., Kiss I., Sándor J., Kisházi P.: A K-ras onkogén 12, 13 és 61 kodonjai mutációjának prognosztikus értéke colorectalis carcinomában. *Orvosi Hetilap*. 140: 1673-1679. 1999.
169. G. Pajkos, I. Kiss, J. Sándor, I. Ember, P. Kisházi: The prognostic value of the presence mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2000. 20: 3 Közlésre elfogadva
170. Hardingham JE., Butler WJ., Roder D., Dobrovic A., Dymock RB., Sage RE., Roberts Thomson IC.: Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut*. 42: 669-672. 1998.

171. Cerottini JP., Caplin S., Saraga E., Givel JC., Benhattar J.: The type of *K-ras* mutation determines prognosis in colorectal cancer. The American Journal of Surgery. 175: 198-202. 1998.
172. Ohnishi T., Tomita N., Monden T., Yana I., Takami K., Yamamoto H., Yagyu T., Kikkawa N., Shimano T., Monden M.: A detailed analysis of the role of *K-ras* gene mutation in the progression of colorectal adenoma. British Journal of Cancer. 75: 341-347. 1997.
173. Kiss I., Sándor J., Pajkos G., Ember I.: *K-ras* point mutations in colorectal cancer and their association with certain alleles of drug metabolizing enzymes. Anticancer Research. 18: 173. 1998.
174. Kiss I., Pajkos G., Bogner B., Sándor J., Dombóvári A., Hegedűs G., Ember I.: Polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP1A1* genes and occurrence of *K-ras* point mutations in colorectal cancers. Cancer Epid. Biomarkers Prev. Közlésre elküldve.
175. Oda Y., Tanaka M., Nakanishi I.: Relation between the occurrence of *K-ras* gene point mutations and genotypes of polymorphic *N-acetyltransferase* in human colorectal carcinomas. Carcinogenesis. 15: 1365-1369. 1994.
176. Roberts Thomson IC., Butler WJ., Ryan P.: Meat, metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. Eur. J. Cancer Prev. 8: 207-211. 1999.
177. Hengstler JG., Arand M., Herrero ME., Oesch F.: Polymorphisms of *N-acetyltransferases*, glutathione *S transferases*, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Res. 154: 47-85. 1998.
178. Lee EJ., Zhao B., Seow-Choen F.: Relationship between polymorphism of *N-acetyltransferase* gene and susceptibility to colorectal carcinoma in a Chinese population. Pharmacogenetics. 8: 513-517. 1998.
179. Kiss I., Dombóvári A., Bogner B., Sándor J., Hegedűs G., Ember I.: Role of allelic polymorphism of *p53* tumor suppressor gene and *NAT2*, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1*, *CYP2E1* metabolizing enzymes in colorectal cancer risk modification. Cancer Lett. Közlésre elküldve.
180. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Allelic polymorphism of metabolizing enzymes influences the sensitivity of colorectal mucosa to dietary carcinogenic factors. Pharmacology & Toxicology. 85: 20-21. 1999.

181. Kiss I., Sándor J. and Ember I.: Allelic polymorphism of GSTM1 and NAT2 genes modifies dietary induced DNA-damage in colorectal mucosa. *Eur. J. Cancer Prev., Közlésre elküldve.*
182. Chen J., Stampfer MJ., Hough HL., Garcia Closas M., Willett WC., Hennekens CH., Kelsey KT., Hunter DJ.: A prospective study of N acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 3307-3311. 1998.
183. Ratto C., Flamini G., Sofò L., Nucera P., Ippoliti M., Curigliano G., Ferretti G., Sgambato A., Merico M., Doglietto GB., Cittadini A., Crucitti F.: Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis. Colon Rectum.* 39: 1238-1244. 1996.
184. Nollau P., Moser C., Weinland G., Wagener C.: Detection of K ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant enriched PCR. *Int. J. Cancer.* 66: 332-326. 1996.
185. Jen J., Johnson C., Levin B.: Molecular approaches for colorectal cancer screening. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 213-217. 1998.
186. Bostrom E., Engen S., Eide I.: Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after spiking with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch. Toxicol.* 72: 645-649. 1998.
187. Kertai P., Ember I., Uzvölgyi É.: "Kísérletes granulocytás leukémia patkányban." *Magyar Belorv. Arch.* 40, 187-197, 1987.
188. Osaka M., Matsuo S., Koh T., Liang P., Kinoshita H., Maeda S., Sugiyama T.: N ras mutation in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced erythroleukemia in Long Evans rats. *Cancer Lett.* 91: 25-31. 1995.
189. Osaka M., Matsuo S., Koh T., Sugiyama T.: Specific N ras mutation in bone marrow within 48 H of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene treatment in Huggins Sugiyama rat leukemogenesis. *Mol. Carcinog.* 16: 126-131. 1996.
190. Ember I., Kiss I., Pusztai Zs.: Effect of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene on onco/suppressor gene action in vivo: A short-term experiment. *Anticancer Research.* 18: 445-448. 1998.
191. Penn I.: Cancers following cyclosporine therapy. *Transplantation.* 43: 32-35. 1987.

192. Olshan AF., Mattison DR., Zwanenburg TS.: International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Cyclosporine A: review of genotoxicity and potential for adverse human reproductive and developmental effects. Report of a Working Group on the genotoxicity of cyclosporine A, August 18, 1993. *Mutat-Res.* 317: 163-173. 1994.
193. Palanduz S., Sever MS., Ozturk S., Tascioglu C., Karan MA., Sonmez G., Cefle K., Guler K.: Genotoxic potential of cyclosporin A in patients with renal transplantation. *Cell. Biol. Toxicol.* 15: 13-17. 1999.
194. Kiss I., Kertai P., Varga Cs., Ember I.: Early cyclosporin effect on oncogene action. *Anticancer Research.* 12: 1811. 1992. (abstract)
195. Ember I., Kiss I., Dezsényi E., Kertai P.: Early Effects of Cyclosporin A on In vivo Oncogene Expression. *Anticancer Research.* 14: 1095-96. 1994.
196. Kadam P., Steele P., Li YQ., Preisler H.: Analysis of the c myc and N ras genes in acute myelogenous leukemia cells which manifest the constitutive expression of the c myc gene. *Anticancer Res.* 13: 747-751. 1993.
197. Ember I., Kiss I., Gombkötő Gy., Müller E., Szeremi M.: Onkogén és szuppresszor gén vizsgálatok etilén-oxid exponált populációban. *Kórház- és Orvostechnika.* 2: 82-91. 1995.
198. Ember I., Kiss I., Málovics I.: Oncogene and tumour suppressor gene expression changes in persons exposed to ethylene oxide. *European Journal of Cancer Prevention.* 7: 167-168. 1998.
199. Ember I., Kiss I., Gombkötő Gy., Müller E., Szeremi M.: Onco and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure. *Cancer Detection and Prevention.* 22: 241-245. 1998.
200. Györi L., Mercz F., Rózsa P.: A GST típusú gázsterilizátorok minősítése, minősége és megbízhatósága. *Kórház- és Orvostechnika.* 32: 262-267. 1994.
201. Chung YJ., Kim KM., Choi JR., Choi SW., Rhyu MG.: Relationship between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. *Int. J. Cancer.* 82: 782-788. 1999.

202. Tam AS., Foley JF., Devereux TR., Maronpot RR., Massey TE.: High frequency and heterogeneous distribution of *p53* mutations in aflatoxin B1 induced mouse lung tumors. *Cancer Res.* 59: 3634-3640. 1999.
203. Akbasak A., Sunar-Akbasak B.: Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J. Neur. Sci.* 111: 119-133. 1992.
204. Cohen P., Seeger R., Triche T., Israel M.: Detection of *N-myc* gene expression in neuroblastoma tumours by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 131: 391-397. 1998.
205. Cheng Y., Ng HK., Ding M., Zhang SF., Pang JC., Lo KW.: Molecular analysis of microdissected de novo glioblastomas and paired astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 120-128. 1999
206. Kiss I., Ember I., Dezsényi E., Csései Gy.: Activation of different oncogenes in malignant brain tumors. *Cancer Detection and Prevention.* 17: 97. 1993. (abstract)
207. Kiss I., Dezsényi E., Csései T., Ember I.: Detection of elevated oncogene expressions in brain tumors and their macroscopically healthy surrounding tissues. *European Journal of Cancer Prevention.* 7: 417-419. 1998.
208. Ember I., Oláh É., Balogh E., Arany I., Rády P., Mátyus L., Szöllösi J., Thomázy V., Kertai P.: "Transplantation of chemically induced mouse leukemias into F344 newborn rats." *Haematologia* 19: 207-217, 1986.
209. J. Hajdú, L. Kozma, Kiss I., Zs. Szentkereszty, Sz. Szakáll, Ember I.: Is the presence of distant metastasis associated with *c-myc* amplification in gastric cancer? *Acta Chirurgica Hungarica.* 36: 119-121. 1997.
210. L. Kozma, Kiss I., Sz. Szakáll, Ember I.: Investigation of *c-myc* oncogene amplification in colorectal cancer. *Cancer Letters.* 81: 165-169. 1994.
211. Kataoka A., Yakushiji M., Ohbuchi T., Morimitsu Y., Kojiro M.: Characterization of oncogenes (*K*, *N-ras* and *N*, *c-myc*) in subcloned cell lines (KCC 1a and 1b) derived from same endometrial carcinoma presenting well differentiated adenocarcinoma and clear cell carcinoma. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 43: 1317-1322. 1991.
212. L. Kozma, Kiss I., A. Nagy, Sz. Szakáll, Ember I.: Investigation of *c-myc* and *K-ras* amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Letters.* 111: 127-131. 1997.

IX. Köszönetnyilvánítás

- Köszönöm Intézetünk igazgatójának, Ember István Professor Úrnak a folyamatos támogatását, és hogy aajtaja mindig nyitva állt előttem.
- Morava Professor Úrnak köszönöm, hogy elindulhattam ezen a pályán.
- Hálás vagyok asszisztensnőmnek, Orsós Zsuzsának, leendő biológusnak.
- Köszönöm Dombóvári Adrienn értékes közreműködését.
- Hálával tartozom továbbá az Intézet mindazon munkatársainak, kollaborációs partnereknek, kollégáknak, akik őszintén segítettek utamon.
- Köszönöm édesanyám, családom segítségét és megértő türelmét.
- PhD disszertációm elkészítése alatt a Soros Alapítvány ösztöndíjban részesített, amiért ezúton is hálás köszönetemet fejezem ki.

X. A disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk

1. Kiss I., Ember I.: Kemilumineszcens reakciók alkalmazása génextpressziós vizsgálatokban. *Egészségtudomány*. 38: 155-160. 1994.
2. I. Ember, I. Kiss., E. Dezsényi., P. Kertai: Early Effects of Cyclosporin A on *In vivo* Oncogene Expression. *Anticancer Research*. 14: 1095-96. 1994.
3. L. Kozma, I. Kiss, Sz. Szakáll, I. Ember: Investigation of *c-myc* oncogene amplification in colorectal cancer. *Cancer Letters*. 81: 165-169. 1994.
4. Ember I., Raposa T., Varga Cs., Herceg L., Kiss I.: Carcinogenic effects of Cytostatic Protocols in CBA/Ca Mice. *In vivo*. 9: 65-70. 1995.
5. Ember I., Raposa T., Varga Cs., Kiss I.: Effect of Different Cytostatic Protocols on Oncogene Expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Research*. 15: 1285-1288. 1995.
6. Ember I., Kiss I.: Concanavalin A hatása egyes onkogének aktivációjára *in vivo*. *Magyar Onkológia*. 39: 55-58. 1995.
7. Ember I., Raposa T., Varga Cs., Kiss I.: Citosztatikus kezelési kombinációk hatása onkogének korai aktivációjára *in vivo*. *Magyar Onkológia*. 4: 167-172. 1995.
8. Ember I., Kiss I., Gombkötő Gy., Müller E., Szeremi M.: Onkogén és szupresszor gén vizsgálatok etilén-oxid exponált populációban. *Kórház- és Orvostechnika*. 2: 82-91. 1995.
9. Ember I., Horváth R., Kiss I. és Kertai P.: Onkogének expressziójának és amplifikációjának vizsgálata kémiai indukált patkányleukémiában. *Magyar Onkológia*. 3: 119-122. 1996.
10. Kiss I. és Ember I.: Molekuláris epidemiológia. *Egészségtudomány*. 40: 286-294. 1996.
11. Kócz A., Varga I., Kiss I., Ember I.: Génextpresszió-változások tüdőrákos betegek fehérvérsejtjeiben. *Egészségtudomány*. 40: 283-285. 1996.
12. L. Kozma, I. Kiss, A. Nagy, Sz. Szakáll, I. Ember: Investigation of *c-myc* and *K-ras* amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Letters*. 111: 127-131. 1997.
13. I. Kiss and I. Ember: Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, and GSTM1 genes: susceptibility to colon cancer. In: Cell injury and protection in

the gastrointestinal tract. Eds: Gy. Mózsik, L. Nagy, A. Pár, K.D. Rainsford. Kluwer Academic Publishers, 1997.

14.I. Ember, I. Kiss, T. Raposa: *In vivo* effects of COPP protocol on onco- and suppressor gene expression in a "follow up study". *In vivo*. 11: 399-402. 1997.

15.I. Ember and I. Kiss: *In vivo* effects of cyclophosphamide on oncogene and suppressor gene expression in a "follow up" study. *Anticancer Research*. 17: 3593-3598. 1997.

16.J. Hajdú, L. Kozma, I. Kiss, Zs. Szentkereszty, Sz. Szakáll, I. Ember: Is the presence of distant metastasis associated with *c-myc* amplification in gastric cancer? *Acta Chirurgica Hungarica*. 36: 119-121. 1997.

17.I. Ember, I. Kiss, Gy. Gombkötő, E. Müller, M. Szeremi: Onco and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure. *Cancer Detection and Prevention*. 22: 241-245. 1998.

18.I. Ember, I. Kiss, Zs. Pusztai: Effect of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene on onco/suppressor gene action *in vivo*: A short-term experiment. *Anticancer Research*. 18: 445-448. 1998.

19.I. Ember, I. Kiss, I. Málovics: Oncogene and tumour suppressor gene expression changes in persons exposed to ethylene oxide. *European Journal of Cancer Prevention*. 7: 167-168. 1998.

20.I. Ember, I. Kiss, G. Nowrasteh, T. Raposa: Effect of ABVD therapeutic protocol on oncogene and tumor suppressor gene expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Research*. 18: 1149-1152. 1998.

21.I. Ember, I. Kiss, É. Vermes: Early effect of cyclophosphamide on oncogene expression *in vivo*. *In vivo*. 12: 201-208. 1998.

22.I. Ember, I. Kiss, T. Raposa, G. Nowrasteh, A.Matolcsy: *In vivo* effects of CHOP protocol on onco and suppressor gene expression in a "follow up study". *In vivo*. 12: 489-494. 1998.

23.I. Ember, I. Kiss Zs. Faluhelyi: Gene expression changes as potential biomarkers of tumor bearing status in human. *European Journal of Cancer Prevention*. 7: 347-350. 1998.

24.I. Kiss, E. Dezsényi, T. Csécei, I. Ember: Detection of elevated oncogene expressions in brain tumors and their macroscopically healthy surrounding tissues. *European Journal of Cancer Prevention*. 7: 417-419. 1998.

25. I. Ember, I. Kiss, G. Nowrasteh: Different H2 haplotypes have a strong influence on oncogene action. *Anticancer Research*. 19: 1181-1186. 1999.
26. Pajkos G., Kiss I., Sándor J., Kisházi P.: A *K-ras* onkogén 12, 13 és 61 kodonjai mutációjának prognosztikus értéke colorectalis carcinomában. *Orvosi Hetilap*. 140: 1673-1679. 1999.
27. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa: The usefulness of *in vivo* gene expression investigations from peripheral white blood cells: A preliminary study. *European Journal of Cancer Prevention*. 8: 331-334. 1999.
28. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, B. Bogner, I. Ember: Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Research*. 20: 519-522. 2000.
29. G. Pajkos, I. Kiss, J. Sándor, I. Ember, P. Kisházi: The prognostic value of the presence mutations at the codons 12, 13, 61 of *K-ras* oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2000. 20: 3 Közlésre elfogadva
30. I. Kiss, G. Pajkos, B. Bogner, J. Sándor, A. Dombóvári, G. Hegedűs, I. Ember: Polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP1A1 genes and occurrence of *K-ras* point mutations in colorectal cancers. *Cancer Epid. Biomarkers Prev.* Közlésre elküldve.
31. I. Kiss, A. Dombóvári, B. Bogner, J. Sándor, G. Hegedűs, I. Ember: Role of allelic polymorphism of *p53* tumor suppressor gene and NAT2, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, CYP2E1 metabolizing enzymes in colorectal cancer risk modification. *Cancer Lett.* Közlésre elküldve.
32. I. Kiss, J. Sándor and I. Ember: Allelic polymorphism of GSTM1 and NAT2 genes modifies dietary induced DNA-damage in colorectal mucosa. *Eur. J. Cancer Prev.*, Közlésre elküldve.

Abstractok

- 33.I. Kiss, P. Kertai, Cs. Varga and I. Ember: Early cyclosporin effect on oncogene action. *Anticancer Research*. 12: 1811. 1992.
- 34.I. Kiss, I. Ember, E. Dezsényi, Gy. Csései: Activation of different oncogenes in malignant brain tumors. *Cancer Detection and Prevention*. 17: 97. 1993.
- 35.I. Ember, I. Kiss, Cs. Varga, P. Kertai: Early effect of cyclophosphamide on oncogene action *in vivo*. *Cancer Detection and Prevention*. 17: 112. 1993.
- 36.I. Ember, I. Kiss: Molecular epidemiological study on ethylene oxide exposed population. *The European Journal of Cancer*. 38: S3. 1994.
- 37.L. Kozma, Sz. Szakáll, I. Kiss and I. Ember: Amplification of *c-myc* oncogene in colorectal cancer. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 33: 297. 1995.
- 38.I. Kiss and I. Ember: Gene expressin during differentiation in a myelomonocytic human leukemic cell line. *Cell Proliferation*. 28: 196. 1995.
- 39.I. Kiss and I. Ember: Lectin effect on oncogene expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Research*. 15: (5A) 1634-35. 1995.
- 40.I. Ember and I. Kiss: The role of carcinogen induced early gene events during carcinogenesis. *Anticancer Research*. 15: (5A) 1821. 1995.
- 41.I. Ember, I. Kiss: *In vivo* oncogene expression changes due to environmental carcinogens. *International Journal of Oncology*. 9: 852. 1996.
- 42.I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: Genetic polymorphism of metabolizing enzymes in patients with lung cancer and silicosis. *International Journal of Oncology*. 9: 853. 1996.
- 43.I. Kiss and I. Ember: Molecular epidemiology of the malignant gastrointestinal diseases. *Digestive Diseases and Sciences*. 41: 434. 1996.
- 44.I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: Influence of genetic polymorphisms on colon cancer susceptibility. *Cancer Detection and Prevention*. 20: 533-534. 1996.
- 45.I. Ember, I. Kiss, J. Sándor, L. Kozma, Sz. Szakáll, A. Nagy: *C-myc* and *K-ras* amplification in renal clear cell adenocarcinoma. *Cancer Detection and Prevention*. 20: 534. 1996.

- 46.I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: K-*ras* point mutations in colorectal cancer and their association with certain alleles of drug metabolizing enzymes. Anticancer Research. 18: 173. 1998.
- 47.I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: Allelic polymorphism of metabolizing enzymes influences the sensitivity of colorectal mucosa to dietary carcinogenic factors. Pharmacology & Toxicology. 85: 20-21. 1999.

Előadások, poszterek

1. Kiss I., Kertai P., Varga Cs., Ember I.: Early Cyclosporin effect on oncogene action. 4th Internat. Conference of Anticancer Res. 1992. Crete, Greece.
2. Kiss I., Ember I., Dezsényi E., Kiss T., Csécsey Gy.: Activation of different oncogenes in malignant brain tumors. International Symposium on Genetic factors in Predictive and Preventive Oncology. Nice 1993. Marc. 14-19.
3. Ember I., Kiss I., Varga Cs. Kertai P.: Early effect of cyclophosphamide on oncogene effect *in vivo*. International Symposium on Genetic factors in Predictive and Preventive Oncology. Nice 1993. Marc. 14-19.
4. Ember I., Kertai P., Varga Cs., Kiss I.: *In vivo* effect of different drugs on oncogenes. EACR 12th Meeting Bruxelles, 1993. April 4-7.
5. Kiss I., Kertai P., Ember I.: Oncogene amplification and altered expression in different chemically induced tumors. EACR 12th Meeting Bruxelles, 1993. April 4-7.
6. Kozma L., Szakáll Sz., Kiss I. és Ember I.: C-myc, N-ras onkogén amplifikációk vizsgálata colorectalis tumorokban. Magyar Pathológusok Társasága 1993. évi Kongresszusa. Salgótarján, 1993.
7. Kiss I., Raposa T., Ember I.: Citosztatikus kezelési protokollok hatása onkogének expressziójára állatmodellben. Magyar Hygiénikus Társaság 26. Vándorgyűlése. Kaposvár, 1993. szeptember 1-3.
8. Kiss I.: Molecular epidemiology of cancer. Course on 'Settings For Health Promotion', Valencia Institute of Studies in Public Health, Valencia, Spain 1993.
9. Kiss I., Ember I.: Early Effects of Concanavalin A on Oncogene expression in Mice. EACR XIII. Berlin, 1994.
10. Ember I., Kiss I.: Molecular epidemiological study on ethylene oxide exposed population. First Educational Convention of the European School of Oncology. Párizs, 1994. június 16-18.
11. I. Kiss, L. Kozma, Sz. Szakáll, and I. Ember: Amplification of c-myc gene in human colon tumours. ESF Conference on Molecular Epidemiology of Cancer. Crete, 1994. September 17-22.

12. Ember I., Raposa T., Kiss I.: Molecular epidemiology of therapy induced malignancies. ESF Conference on Molecular Epidemiology of Cancer. Crete, Greece, 1994. September 17-22.
13. Ember I., Kiss I.: Effect of Occupational Exposure on Oncogene Action. International Symposium on Human Health and Environment. Salsomaggiore Terme, Italy, 1994. September 25-30.
14. Kiss I., Zólyomi A., Ember I.: Effect of Concanavalin A on Oncogene Expression in a Human Leukemia Cell Line. 41st International Congress of ETCS. Verona, 1994. október 9-12.
15. Ember I., Kiss I.: Micro-molecularepidemiological study on ethylene oxid exposed population. UICC XVI International Cancer Congress. New Delhi, 1994 October 30-November 5.
16. I. Kiss, I. Ember, L. Kozma, Sz. Szakáll: Amplification of *c-myc* and *N-ras* genes in human colon tumors. UICC XVI International Cancer Congress. New Delhi, 1994 October 30-November 5.
17. Kiss I., Ember I.: Concanavalin A hatása onkogének expressziójára humán myelomonocitás leukémia sejtekben. III. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Pécs, 1995. január 23-25.
18. I. Kiss and I. Ember: Gene expression during differentiation in a myelomonocytic human leukemic cell line. Conference of The European Study Group for Cell Proliferation. London, 1995, May 30-June 3.
19. I. Ember, I. Kiss and É. Vermes: Early effect of cyclophosphamide *in vivo* on oncogene action. 25th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Noordwijkerhout, Hollandia, 1995. June 18-23.
20. Kozma L., Szakáll Sz., Kiss I., Ember I.: *C-myc* onkogén amplifikációja kolorektális karcinomában. 37. Magyar Gasztroenterológiai Kongresszus. Balatonaliga, 1995.
21. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa: Molecular Epidemiology of Cytostatic Drug Exposed Population on Gene Level. 2nd International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations. Prága, 1995. augusztus 20-25.
22. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa: Molecular epidemiology of therapy induced malignancies. XIIIth Meeting of the International Society of Haematology. Istanbul, 1995. szeptember 3-8.

23. I. Kiss and I. Ember: Molecular epidemiology of gastrointestinal diseases. Fourth International Symposium on Cell Injury and Protection in the Gastrointestinal Tract. Pécs, 1995. október 8-11.
24. I. Kiss and I. Ember: Lectin effects on oncogene expression in CBA/Ca mice. Fifth International Conference of Anticancer Research. Corfu, 1995. október 17-22.
25. I. Ember and I. Kiss: The role of carcinogen induced early gene events during carcinogenesis. Fifth International Conference of Anticancer Research. Corfu, 1995. október 17-22.
26. Kiss I., Ember I.: Genetikai polimorfizmus szerepe egyes daganatok kialakulásában. Magyar Onkológusok Társasága XXI. Nemzeti Kongresszusa. Pécs, 1995. november 9-11.
27. I. Kiss and I. Ember: Polymorphisms of GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 genes and susceptibility to colon cancer. 'Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis' Conference. Keystone, USA, 1996. február 19-29.
28. I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: Genetic Susceptibility to Cancer: Polymorphism of Drug Metabolizing Enzymes. Third International Congress of the Worldwide Hungarian Medical Academy. Pécs, Hungary, 1996. July 4-6.
29. I. Ember, I. Kiss: DMBA-induced early changes of oncogene and tumour suppressor gene expression in rats. 26th EEMS Annual Meeting: Workshop on chromosome instability and cell cycle control. Rome, 1996. szeptember 3-7.
30. I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: A new possibility for the primary prevention of chronic non communicable diseases: Investigation of individual susceptibility. 3d Joint Conference of Hungarian-Polish Hygienic Societies. Krakko, 1996. szeptember 13-14.
31. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Genetikai tényezők jelentősége a daganatok primer prevenciójában. A Magyar Higiénikusok Társasága 28. Vándorgyűlése. Balatonföldvár, 1996. szeptember 25-27.
32. I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: Genetic polymorphism of metabolizing enzymes in patients with lung cancer and silicosis. International Conference on Experimental and Clinical Oncology. Island of Kos, Greece, 1996. október 3-5.

- 33.I. Ember and I. Kiss: *In vivo* oncogene expression changes due to environmental carcinogens. International Conference on Experimental and Clinical Oncology. Island of Kos, Greece, 1996. október 3-5.
34. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: Influence of genetic polymorphisms on colon cancer susceptibility. 3rd International Symposium: Impact of cancer biotechnology Diagnostic & Prognostic Indicators. Nice, France, 1996. október 26-28.
35. I. Ember, I. Kiss, J. Sándor, L. Kozma, Sz. Szakáll, A. Nagy: *C-myc* and *K-ras* amplification in renal clear cell adenocarcinoma. 3rd International Symposium: Impact of cancer biotechnology Diagnostic & Prognostic Indicators. Nice, France, 1996. október 26-28
36. Kiss I.: A nyelvőcső-és gyomordaganatok molekuláris epidemiológiája. Az egyéni érzékenység szerepe a daganatok kialakulásában. POTE Második Tudományos Hétvége. Pécs, 1996. november 29-30.
37. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: Individual susceptibility to colorectal cancer and distribution of *K-ras* point mutations in colorectal tumours. Gene-Environment Interactions in Occupational and Environmental Health. Espoo, Finnország, 1997. szeptember 2-5.
38. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa. ABVD therapeutic protocol elevate the oncogene expression in animal model. Satellite Meeting ICEM 1997. Heidelberg, Germany, 1997. september 4-6.
39. Kiss I., Sándor J., Ember I.: A daganatok megelőzésének új adatai: metabolizáló enzimek polimorfizmusai. Magyar Higiénikusok Társasága 29. Vándorgyűlés. Balatonföldvár, 1997. szeptember 24-26.
40. Ember I., Kiss I., Málovics I.: Ethilénoxid exponáltak géneexpresszió válasza munkaegészségügyi intézkedések hatására. Magyar Higiénikusok Társasága 29. Vándorgyűlés. Balatonföldvár, 1997. szeptember 24-26.
41. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Genetika helye a népegészségügyben. Népegészségügyi Tudományos Társaság Kongresszusa. Hévíz, 1997.
42. Sándor J., Kiss I., Ember I.: Biomonitorozás lehetőségei környezetszennyező források közelében. Népegészségügyi Tudományos Társaság Kongresszusa. Hévíz, 1997.
43. L. Kozma, I. Ember, I. Kiss, J. Hajdú, Zs. Szentkereszty, Sz. Szakáll: *C-myc* amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. Gastroenterological Congress. Balatonaliga, 1997.

44. I. Kiss, Ember I.: New metastatic model: Role of oncogenes. The 2nd World Congress on advances in Oncology. Vouliagmeni, Athens, Greece, 1997. october 16-18.
45. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa. Molecular events during copp protocol induced carcinogenesis. The 2nd World Congress on advances in Oncology. Vouliagmeni, Athens, Greece, 1997. october 16-18.
46. Kiss I., Sándor J., Pajkos G., Ember I.: Metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusa és *K-ras* pontmutációk megoszlása vastagbél-daganatokban. Magyar Onkológusok Társasága XXII. Nemzeti Kongresszus. Budapest, 1997. november 10-12.
47. Ember I., Kiss I., Raposa T.: Citosztatikus kezelési protokollok hatása onko- és szuppresszor gének expressziójára állatkísérletekben. országos haematológiai és Immunológiai . Budapest, 1997. november 19.
48. Kiss I.: Az egyéni érzékenység szerepe a sporadikus colorectalis daganatok kialakulásában. IX. Pécsi Tudományos Hétfége. Pécs, 1998. január 30-31.
49. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: Genetic polymorphisms as biomarkers of individual sensitivity to colorectal cancer and their possible prognostic application. Innovative Approaches to the Prevention, Diagnosis, and Therapy of Cancer. Maui, Hawaii, 1998. February 16-21.
50. Kiss I.: Genetikai polimorfizmusok jelentősége a daganatok iránti érzékenység alakításában: a kvantitatív becslés lehetőségei. Népegészségügyi Tudományos Társaság VII. Nagygyűlése. Pécs, 1998. április 23-25.
51. I. Ember, I. Kiss. Different H-2 haplotypes have a strong effect on oncogene expression. 17th International Cancer Congress. Rio de Janeiro, Brazil, 1998. August 23-28.
52. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos and I. Ember: Allelic polymorphism of metabolizing enzymes and their effect on colorectal carcinogenesis. EEMS 28th Annual Conference. Salzburg, 1998. szeptember 7-11.
53. I. Ember, I. Kiss, T. Raposa, G. Nowrasteh, A. Matolcsy: Effect of chop cytostatic protocol on onco- and suppressor gene expression in CBA/CA mice. EEMS 28th Annual Conference. Salzburg, 1998. szeptember 7-11.
54. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos and I. Ember: *K-ras* point mutations in colorectal cancer and their association with certain alleles of drug metabolizing enzymes. Sixth International Conference of Anticancer Research. Kallithea, Greece, 1998. október 21-25.

55. L. Kozma, I. Kiss, J. Hajdu, Z. Szentkereszty, S. Szakáll, I. Ember: Is metastasis associated with *c-myc* amplification in gastric?. 4th International Symposium on Predictive Oncology and Therapy. Nice, France, 1998. october 24-27.
56. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Genetikai polimorfizmusok hatása dohányzás által okozott DNS-károsodás mértékére. Népegészségügyi Tudományos Társaság VIII. Nagygyűlése. Sopron, 1999. április 22-25.
57. I. Ember, I. Kiss: . Onco and suppressor gene expression is a useful marker of chemical carcinogenesis. 16th International Conference on Human Tumor Markers. Budapest, 1999. June 13-16
58. I. Kiss, J. Sándor, I. Ember: Allelic polymorphism of metabolizing enzymes influences the sensitivity of colorectal mucosa to dietary carcinogenic factors. 29th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. Copenhagen, Denmark 1999. július 4-9.
59. I. Ember, I. Kiss, Z. Gyöngyi. Onco and suppressorgene expression is useful biomarkers of the early step on chemical carcinogenesis. The Biology and Genetics of Early Detection and Chemoprevention of Cancer. Bal Harbour, USA 1999. October 6-10.
60. Tóth L., Kozma L., Gyarmati I., Szakáll Sz., Pocs E., Kollár S., Kiss I., Ember I.: *C-myc* és *K-ras* onkogének amplifikációjának vizsgálata nem-kissejtes hörgőrákban. Magyar Onkológusok Társasága XXIII. kongresszusa. Budapest, 1999. november 12-14.
61. I. Ember, I. Kiss , Z. Gyöngyi: Onco and suppressorgene expression is good biomarker for early detection of chemical carcinogenesis expression. Conference on Screening and Early Detection of Cancer. Vienna, 1999. november 18th -19th
62. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusa és a daganatok iránti egyéni érzékenység. Népegészségügyi Tudományos Társaság IX. Nagygyűlése. Hévíz, 2000. április 13-15.
63. I. Kiss, J. Sándor and I. Ember: Genetic susceptibility, ethnic differences and occupational cancer. 14th Congress of the International Association of Agricultural Medicine and Rural Health. Pécs, 2000. május 25-27.