

Aranyrettel kitüntetett

**Molekuláris epidemiológiai módszerek
alkalmazásának lehetőségei**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Kiss István

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Humán Közegészségtani Intézet**

2000

I. Bevezetés

A 'daganatok molekuláris epidemiológiája' – kifejezés először az 1980-as évek elején jelent meg az irodalomban, és ezzel egy új tudományág alapjainak lerakása kezdődött el. A molekuláris epidemiológia az epidemiológia egy részterülete, definícióját röviden úgy fogalmazhatjuk meg, mint "molekuláris biológiai módszerek alkalmazását az epidemiológiában". 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. PhD értekezésem a daganatok molekuláris epidemiológiájának három területét érinti:

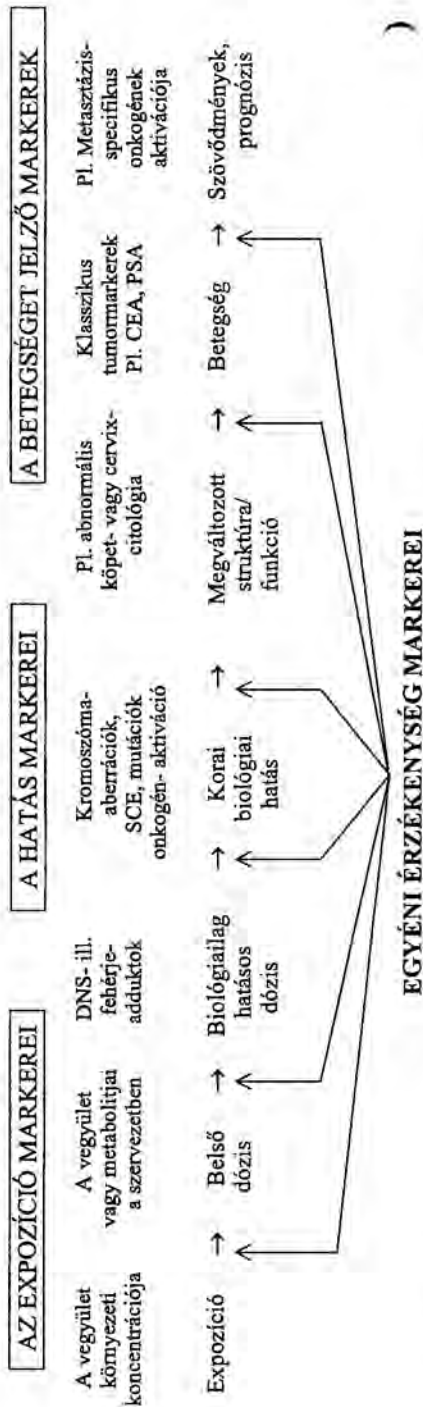
- A daganatokkal kapcsolatos biomarkerek kutatásának napjainkban talán a legdinamikusabban fejlődő területe a daganatok iránti egyéni érzékenység biomarkereinek vizsgálata. Ilyen tényezők például a karcinogén vegyületeket metabolizáló enzimek géneinek allélpolimorfizmusai. Az egyéni érzékenységet befolyásoló tényezők kifejthetik hatásukat az expozíciótól a betegség kialakulásáig vezető folyamat minden lépésénél. Vizsgálatuk különösen preventív aspektusból fontos, hogy segítségükkel megtalálhassuk azokat a "high-risk" populációkat illetve személyeket, akik fokozottan veszélyeztetettek a daganatkialakulás szempontjából. Újtonnan 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 szövetekben, szövetekben. Előnyük, hogy alacsony 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 terápia 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

HAGYOMÁNYOS EPIDEMIOLOGIA

EXPOZÍCIÓ → → BETEGSÉG

MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLOGIA



EGYÉNI ÉRZÉKENYSÉG MARKEREI

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

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

gyógyító munkában. Ez az a vezérfonal, amely a fenti három, néha látszólag csak lazán egymáshoz kapcsolódó terület közötti egységet megteremti.

1.1. A daganatok iránti egyéni érzékenység markerei: metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusa.

Környezetünkől 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 enzimeink végzik. Mivel környezeti eredetű karcinogén-expozíció szinte minden daganattípus etiológiájában fellelhető, 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. 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.

Metabolizáló enzimeink aktivitását számos tényező befolyásolja, alapvető meghatározó tényező azonban a genotípus. Többségük ugyanis genetikailag polimorf, azaz többféle allélljük ismeretes. 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). Az enzimaktivitások egyéni variabilitása mögött álló legfontosabb tényező tehát a metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusa. Végső soron tehát ezen allépolimorfizmusok befolyásolhatják egyes daganatok iránti egyéni érzékenységünket.

A daganatok iránti egyéni érzékenység tanulmányozásához a vastag- és végbéldaganatokat választottuk. A vizsgálatokban az alábbi genetikai polimorfizmusok szerepeltek:

- **Glutation-S-transzferáz M1 (GSTM1) és glutation-S-transzferáz T1 (GSTT1).** A gének a glutation-S-transzferáz (GST) gén-szupercsalád tagjai, amely II-es fázisú, detoxikáló enzimeket foglal magában. Fontosságukat jelzi, hogy a legtöbb – lehetséges, hogy az összes – ismert élő szervezetben, sejtben előfordulnak. A GST enzimek biokémiai funkciója a glutationnal való konjugáció, az eredetnél vízzoldékonyabb, a szervezetből könnyebben eltávolítható metabolitot eredményez. Mivel a redukált glutation kénatomja többféle elektrofil csoporttal is képes reakcióba lépni, a GST-k szubsztrátja igen sokféle vegyület lehet, például

oxidatív stressz által okozott reakciótermékek, vagy számos környezeti eredetű karcinogén anyag. Itt ki kell emelni a policiklikus aromás szénhidrogéneket, amelyek gyakran epoxid-csoportot tartalmazó metabolitá alakulnak az I-es fázisú enzimek hatására, és ezek az epoxidok a μ és a π enzimeknek jó szubsztrátjai. A GSTT1 enzim is számos karcinogén anyagot konjugál, metilálószerkeket, peszticideket, ipari oldószereket, például monohalometánokat és az etilénoxidot. A GSTM1 és a GSTT1 enzimek genetikai polimorfizmusait tekintve a legjelentősebb az úgynevezett 0/+ polimorfizmus. 0 allél a gént érintő deléción következményeképpen jön létre, a homozigóta 0 genotípusúaknak tehát nincsen funkcióképes GSTM1 enzimjük (+ allélnak a nem deletált, működőképes gént nevezzük). A GSTM1 homozigóta 0 genotípus előfordulása meglehetősen gyakori, európai és észak-amerikai fehér populációkban 40-60% körüli, míg a GSTT1 0 genotípus ennél valamivel ritkább (10-20%). Eddigi ismereteink szerint feltételezhető, hogy a 0 genotípusú személyek daganatok iránti érzékenysége nagyobb, a kieső detoxikáló funkció miatt. Ezt eddig legmeggyőzőbben pl. a GSTM1 és a tüdőrák vagy hólyagtumorok vonatkozásában sikerült igazolni.

➤ **Citokróm P450 1A1 (CYP 1A1).** Az enzim 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. 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 karcinogéné teszi a szervezetbe prokarcinogén formájában bejutott vegyületeket. A CYP1A1 genetikai polimorfizmusai közül az *Ile/Val* polimorfizmust vizsgáltuk, ami a gén 7-es exonjának területén levő A-G polimorfizmus következménye, és az egyes 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%. Valószínűleg ennek a különbségnek tudható be, hogy a daganatok iránti egyéni érzékenységre gyakorolt hatás vizsgálata során a japán és az európai ill. amerikai vizsgálatok gyakran ellentmondó eredményekre jutottak: A *Val* allél jelenléte az ázsiai populációkban fokozta a tüdőrák, a szájüregi daganatok, és még néhány más daganat kialakulásának kockázatát, míg fehér populációkban ezt többnyire nem sikerült megerősíteni.

➤ **Citokróm P450 2E1 (CYP 2E1).** Ez az I-es fázisú metabolizáló enzim többféle reakciót katalizálhat, a legjelentősebb a monooxygenálás, 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, acetón, benzol, anilin, kloroform, halotán, N-nitrozovegyületek, széntetraklorid, etilénlikol, sztirén. Polimorfizmusai közül vizsgálatainkban az 5' nem kódoló régióban levő *PstI* és *RsaI* polimorfizmusokat tanulmányoztuk, amelyek gyakorlatilag teljesen kapcsolatos örökölődnek egymással. Az *RsaI* ill. *PstI* RFLP-vel kapott alléleket c1 és c2 alléleknek nevezzük, a c2 a ritkább allél. A c2 allél

előfordulási gyakorisága mind fehér és amerikai fekete (1-5%), mind ázsiai (19-28%) populációkban alacsonyabb, mint a c1 allél. A daganatok kialakulásának kockázatára vonatkozó vizsgálatok az eddig említett enzimpolimorfizmusoknál kevésbé egyértelmű eredményeket szolgáltattak.

➤ **N-acetiltranszferáz 2 (NAT2).** A II-es fázisú enzim számos aromás amin metabolizmusában, illetve hidrazinszerkező vegyületek átalakításában vesz részt. 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 általánosságban detoxikáló enzimeknek tekintjük, a NAT enzimek az O-acetiláción keresztül számos karcinogén aktivációját segíthetik elő. Ezért a NAT2 hatásaira nézve különösen igaz, hogy szerv- daganat- és szubsztrátspecifikusan kell vizsgálnunk azokat. A NAT2 génnek számos alléja ismeretes, amelyeket az enzimaktivitást alapul véve két csoportba – lassú és rapid acetilálók – sorolhatunk. A lassú acetilálók fokozottabb a kockázata hólyagtumorok kialakulása tekintetében, míg a rapid metabolizálók között gyakoribbak a vastag- és végbéldaganatok.

➤ **p53 tumor szuppresszor gén.** A p53 tumor szuppresszor gén kulcsszerepet játszik a sejtciklusnak, illetve a sejt fontos életfolyamatainak (replikáció, DNS-repair, apoptózis) szabályozásában, és ezáltal – strukturális vagy funkcionális ill. regulációs zavarok esetén – a karcinogenezisben. A gén mutációit a humán daganatok jelentős részében kimutatták. A p53 tumor szuppresszor génnek genetikai polimorfizmusai is ismertek, melyek közül a leggyakrabban a 72-es kodon területén levő G-C bázisszubsztitúciót – ami aminosavszinten *Arg/Pro* polimorfizmusban nyilvánul meg – vizsgálták. A rendelkezésre álló adatok szerint a *Pro* allél a tüdőrák fokozottabb kockázatával jár együtt.

II.2. Korai biológiai hatás markerei: Génextpresszió-változások.

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. 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 onkogéneknek 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. Az említett genetikai változások gyakran járnak együtt a génextpresszió megváltozásával, akár közvetlen okként szerepelve, akár valamilyen szabályozórendszeren keresztül történő visszacsatolás következtében. Génextpresszió-változások történhetnek továbbá más genetikai változásoktól függetlenül is, pusztán szabályozó mechanizmusok hatására. A

molekuláris epidemiológia szerint a **korai génextpresszió-változások a korai biológiai hatás markereihez sorolhatók** (míg 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 biológiailag hatásos dózis markerei egyértelműen az expozíció mértékére, és esetleg szerv- illetve szövetspecifitására adnak felvilágosítást. A másik oldalon, a megváltozott struktúra vagy funkció markerei már a betegséget közvetlenül megelőző állapot kialakulására figyelmeztetnek. 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. 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) érzékenységét, válaszreakcióit az expozícióra, vagyis azt a biológiailag releváns változásokhoz közelebb állva mérik. Éppen ezért veszélyeztetettség jelzésére az expozíció korai biomarkereiként jól alkalmazhatók. Mindazonáltal elképzelhető, hogy a génextpresszió-változások a betegség kialakulásának közvetlen veszélyére figyelmeztető – azaz prognosztikus – markereként is használhatók legyenek bizonyos esetekben, elsősorban akkor, ha ezek az expresszió-változások hosszú időn keresztül fennmaradnak. Vizsgálatainkban – néhány kísérlettől eltekintve, amelyek szélesebb spektrumot fogtak át – a *c-myc*, a *p53* géneket, és a *ras* géncsalád valamelyik tagjának expresszióját mértük. 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. **Daganatos sejtvonalakban, daganatokban nem ritka a *c-myc* overexpressziója**, valamint erős transzkripciós aktivitást mutat még fokozott sejtproliferációval járó folyamatokban. 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 apoptosishoz viheti a sejtet.** A *p53* reguláció igen lényeges eleme a poszttranszlációs szabályozás, ami a protein aktiválódását, illetve stabilizálódását, majd később lebomlását eredményezheti. Valószínűleg ez magyarázza, hogy a *p53* daganatokban talált expressziójával, módosulásaival kapcsolatban a DNS, illetve RNS és a fehérjeszintű vizsgálatok eredményei gyakran nem pontosan egyezők. A poszttranszlációs szabályozás fontos szerepe ellenére **mRNS szinten is számos vizsgálat talált *p53* expresszió-változásokat daganatsejtekben, vagy karcinogén vegyületekkel történő kezelés hatására.** A *ras* géncsalád tagjai a sejten belüli jelátviteli kaskád fontos elemei. A fehérjék a sejtmembránhoz kötődtek, és GTP-áz aktivitást mutatnak. A jel továbbítása fehérjefoszforilációs kaskádon keresztül történik. 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.** A *ras* gének amplifikációját viszonylag ritkán, overexpresszióját viszont annál gyakrabban írták le daganatokban, daganatos sejtvonalakban, vagy karcinogén kezelés hatására.

1.3. Prognosztikus markerek: Génamplifikációk.

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, a neuroblastomákban pedig az *N-myc*-génamplifikáció. 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, az *erbB-2* amplifikáció az emlőtumorokban, valamint nagyon erős összefüggés van az *N-myc* amplifikáció megléte – illetve mértéke – és a neuroblastomák prognózisa között. Mint az eddigiekből is kitűnt, a ***c-myc* protoonkogén amplifikációja nem ritka különböző daganatokban.** Előfordul a gyomor-béltraktus daganataiban, például vastagbél-daganatokban és gyomorrákban. A gyomorrákokkal kapcsolatos prognosztikus értékének vizsgálatáról többen beszámoltak, de az eredmények nem voltak teljesen egybehangzóak.

II. 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 polimorfizmusának 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 köztük levő kölcsönhatásokkal is. Ezért a fenti polimorfizmusok tekintetében a több "high-risk" allélt hordozó személyek kockázatát elemeztük.
4. A genetikai polimorfizmusok vizsgálatának új aspektusa a genotípus összevetése a daganat klinikopathológiai 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 széketből 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 (7,12-dimetilbenz[*a*]antracénnel) 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* génexpresszió-változásokat mértük.
8. Hogy a gyakorlati felhasználás lehetőségeit igazoljuk, a génexpresszió-változások humán alkalmazhatóságát is demonstrálni akartuk. Etilén-oxiddal exponált kórházi dolgozókat vizsgáltunk, és a perifériás vérből izolált fehérvérsejtekben mért génexpressziókat hasonlítottuk össze nem exponált kontroll csoporttal, hogy megállapítsuk, detekálható-e kísérleti rendszerünkben az etilén-oxid expozíció hatása.
9. A génexpresszió-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 génexpressziók 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. Eppen ezért célul tűztük ki a c-myc-génamplifikáció vizsgálatát vastagbél- gyomor- és vesedaganatokban, és az adatok összevetését a klinikopathológiai 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.

III. Anyag és módszer

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.

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

DNS-izolálás (szövetmintából, tumorból): A DNS izolálás standard fenol-kloroformos módszerrel történt.

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.

Nukleinsavak blotolása, hibridizálás: Blotoláskor 10 (egy-egy kísérleteknél 5) μg nukleinsavat vittünk Hybond N+ (Amersham) membránra, az Amersham ECL-kitben megadott protokoll szerint, Hoefer slot-blotter segítségével, majd kemilumineszcensen jelölt (Amersham ECL) próbával 42 °C-on éjszaka 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*, 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.

Statisztikai módszerek: A géneexpresszió-változások mértékét, a Comet-assay-ben kapott tail-moment értékeket t-próbával, a géneexpresszió-változásokat mutató állapotok számát χ^2 -próbával hasonlítottuk össze, SPSS PC+ statisztikai program segítségével. A géneamplifikáció-vizsgálatoknál az amplifikációk és a klinikai, szövettani paraméterek közötti kapcsolatot lineáris regresszió-számítással elemeztük (SPSS PC+) A prognosztikus markerek vizsgálatokor 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 esély-hányadost (OR) és 95% megbízhatósági tartományt számítottunk, az Epi Info 6.0 programmal (CDC, Atlanta).

Kísérleti állatok, kezelési protokollok: A 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.

CYP1A1 (Ile/Val polimorfizmus): A 7-es exonban levő *Ile/Val* polimorfizmust allélspecifikus polimeráz-láncreakció (PCR) segítségével vizsgáltuk. Ez két csőben

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

CYP2E1 (PstI polimorfizmus): A genotipizálást PCR-RFLP segítségével végeztük. A PCR amplifikáció után keletkező DNS-szakaszt 2 U *PstI* restrikciós enzimmel (SIGMA) emésztettük és 2%-os agaróz gélben elektroforézis végeztünk.

GSTM1 (homozigóta 0 genotípus): A homozigóta deléció kimutatása kérdéses szakasz PCR amplifikációján alapulva, egyidejű belső kontroll jelenlétében.

GSTM1 – GSTT1 genotipizálás: Azokban a kísérletekben alkalmaztuk, ahol GSTM1 és GSTT1 genotipizálás is történt. A PCR reakcióelegyben mind a GSTM1, mind a GSTT1 specifikus primerek, valamint kontrollként a β -globin gén egy szakaszára specifikus primerek voltak jelen.

p53 (72-es kodon Arg/Pro polimorfizmus): Allélspecifikus PCR segítségével vizsgáltuk, két csőben párhuzamosan, ugyanazzal a 3' primerrel, és az utolsó bázisukban különböző 5' primerekkel.

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 alléje „lassú” allél volt.

K-ras pontmutációk vizsgálata: A vizsgálat mutáns allél specifikus amplifikáció (MASA) segítségével történt. 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).

Comet-assay (SCGE= single cell gel electrophoresis): A sejtek agaróz gélben történő immobilizálása és a maghártya roncsolása után alkalikus közegben történő gélelektroforézist végeztünk, majd a lemezeket etidium-bromidos festés után fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Ekkor a lánctöréseket szenvedett, rövidebb DNS-szakaszok gyorsabban migrálnak (az üstökös csóvája), mint a mag többségét adó ép, hosszú lánccal DNS (az üstökös feje). A lánctörések arányának meghatározása a csóva méretének és intenzitásának a fejhez viszonyításával történik, az ún. tail-moment számításával Comet Analysis szoftver segítségével (Euclid Analysis, St. Louis, MO, USA. Lemezenként 50 üstököst értékeltünk).

Sejtek izolálása székletből (Comet-assay-hez): Az izolálás a széklet N-acetilciszteint tartalmazó oldatban 4 °C-on történő diszpergálását követő PERCOLL centrifugálással történt.

A 2x2 napos táplálkozási útmutató a DNS-lánctörések vizsgálatánál: Az első két napon hús- és hűskészítmények 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.

IV. Eredmények és megbeszélés

I. Eset-kontroll vizsgálatban 163 colorectalis daganatos beteget genotipizáltunk GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 génekre vonatkozóan, és az allélgyakoriságokat összehasonlítottuk a kontroll populációban talált gyakoriságokkal.

GSTM1	CYP1A1	CYP2E1
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: –

Genotípusok megoszlása a kontroll-csoportban (n=163)

GSTM1	CYP1A1	CYP2E1
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%)

Genotípusok megoszlása colorectalis daganatos betegekben (n=163)

A kontroll csoport allélgyakoriságait irodalmi adatokkal összevetve azt láthatjuk, hogy a magyarországi népesség átlagos allélmegoszlásai tehát a fenti három enzim tekintetében más európai populációkéhoz hasonlóak. A feltételezett "high-risk" allélek (CYP2E1 c2, CYP1A1 Val és GSTM1 0) és a colorectalis daganatok közötti kapcsolatot a következő táblázat mutatja:

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	OR: 1.91 95% CI: 1.05 – 3.52

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).

Ebben a vizsgálatban egyrészt a CYP 2E1 c2 allél egyéni érzékenységet fokozó hatását sikerült demonstrálni, másrészt pedig azt, hogy ha több, önmagában kisebb hatású kockázati tényező egyidejűleg van jelen, az már jelentős mértékű (OR: 4.62) kockázatemelkedéshez vezethet.

II. Hogy saját anyagunkon tisztázzuk a K-ras onkogén pontmutációinak esetleges prognosztikus jelentőségét, vastag- illetve végbéldaganatok mutációs státuszát összevetettük a rendelkezésre álló klinikopathológiai adatokkal, illetve a betegek túlélésével. Az elemzést a BM Központi Kórházából származó 88 archív mintán végeztük el, a betegek kórtörténetére vonatkozó adatokkal összevetve.

A daganat lokalizációja szerint csoportosítás 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).

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. Dukés 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).

Vizsgálatunk tehát alátámasztja azt a feltételezést, hogy a K-ras pontmutációk előfordulása a vastagbéldaganatos betegek egyes csoportjaiban prognosztikus tényező, mégpedig rosszabb prognózis jele. Esetünkben ezt a Dukés B stádiumú betegek csoportjára nézve sikerült igazolni.

III. Az eddigi eredményeink egyrészt azt mutatták, hogy a metabolizáló enzimek "high-risk" alléljei fokozzák a colorectalis daganatok kialakulásának kockázatát, másrészt pedig azt igazoltuk, hogy a K-ras pontmutációk befolyásolhatják – a betegek egyes alcsoportjaiban – a betegség prognózisát. A következőkben pedig 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. Itt 140 colorectalis daganatos betegből származó mintán végeztük el a K-ras pontmutációk analizését, illetve genotipizáltuk a betegeket GSTM1, CYP1A1 és CYP2E1 metabolizáló enzimekre vonatkozóan, és az allélpolimorfizmus-megoszlásokat összevetettük a K-ras mutációk előfordulásával:

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

K-ras pontmutációk előfordulása colorectalis daganatmintákban.

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

K-ras mutációk előfordulása a "high-risk" metabolizálók csoportjában

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

K-ras mutációk előfordulása a "low-risk" metabolizálók csoportjában

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

K-ras pontmutációk jelenléte és az enzim-allélpolimorfizmusok közötti kapcsolat

Eredményeink szerint 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 c1** allélt hordozók között. Ez arra utal, 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.

IV. Mivel az eddig vizsgált enzimeken kívül más genetikai polimorfizmusok is hatással lehetnek a colorectalis daganatok iránti egyéni érzékenységre, a következőkben (egy új, 97 fős mintán) az eddigi polimorfizmusok mellett a **GSTT1**, **NAT2** és a **p53** gének allélpolimorfizmusait is vizsgáltuk, az alábbi eredménnyel:

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
NAT2 (rapid acetilálók)	1.95	1.06-3.59
CYP1A1 (Val allél)	1.47	0.73-2.97
CYP2E1 c2 allél	1.49	0.69-3.23
p53 (Pro allél)	1.88	1.02-3.49

Allélpolimorfizmusok hatása a vastag- és végbéldaganatok kialakulásának kockázatára

Bizonyos allélpárok egyidejű előfordulását vizsgálva olyan allélkombinációkat találtunk, amelyek egymás hatását fokozva jelentősen emelik a daganatos kockázatot:

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

Gén-gén kölcsönhatások a karcinogenezisben: "High-risk" allélek együttes előfordulása

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:

"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

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).

A fentiekben a **NAT2** rapid acetilálók és a **p53 Pro** allélt hordozók magasabb kockázatát sikerült igazolni. Bizonyítottuk továbbá egyes „high-risk” allélpárokat hordozó személyek jelentősen emelkedett kockázatát, illetve azt, hogy a több „high-risk” allélt hordozó személyek száma szignifikánsan gyakoribb a colorectalis daganatos betegek között, mint a kontroll csoportban.

V. Mivel a daganatkialakulás kockázatát környezeti és genetikai tényezők kölcsönhatása határozza meg, a továbbiakban az előző vizsgálatban szignifikáns kockázatemelkedést okozó **NAT2** és **p53** polimorfizmusokat elemeztük tovább, egy táplálkozási tényezővel (húsfogyasztás) való kölcsönhatásban. A vizsgált személyeket **NAT2** és **p53** genotípusuk alapján 10 fős csoportokba osztottuk, majd 2 nap vegetáriánus táplálkozás, illetve 2 napi bőséges hústartalmú étkezés után meghatároztuk a székletből izolált, lesodródott bélnyálkahártya-sejtekben mérhető DNS-károsodás mértékét (az egyes láncú törések mértékét vizsgáltuk Comet-assay segítségével):

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

*p<0.05

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

DNS-károsodás mértéke (tail-moment) **NAT2** genotípusok szerint

A hús fogyasztás mindegyik csoportban növelte a DNS-lánc törések mennyiségét, de ez a növekedés csak a GSTM1 0 genotípusúak és a NAT2 rapid acetilálók között volt statisztikailag szignifikáns. Sikerült igazolni, hogy a vizsgált „high-risk” allélek már a DNS-lánc törések kialakulásának szintjén befolyásolják a környezeti (esetünkben táplálkozási) tényező hatásának érvényre jutását. 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.

VI: A géneexpresszió-változások, mint korai hatást jelző markerek vizsgálatát először genotoxikus karcinogén alkalmazásával, állatmodellben vizsgáltuk. Long-Evans patkányok 7,12-dimetilbenz[*a*]antracénnel (DMBA) történő kezelése hatására 24 órával a kezelés után a *c-myc* és a *H-ras* gének expressziója szignifikánsan emelkedett a kontrollokhoz képest, a lépben vizsgálva. Ez a szervspecifikus változás (a májban nem találtunk overexpressziókat) összhangban van a DMBA leukemogén hatásával. Mivel az eddigi irodalmi adatok szerint a Long-Evans patkányokban indukált leukémiával kapcsolatos legkorábbi génszintű elváltozást (*N-ras* pontmutáció) 48 óra múltán találták, az általunk használt módszer tehát a pontmutációk vizsgálatánál korábbi biomarkerek bizonyult ebben a modellben.

VII: A nem genotoxikus hatású karcinogének hatásának modellezésére a ciklosporin választottuk. Ismeretes, hogy a ciklosporin egyes esetekben szekunder daganatok kialakulásához vezet, bár a rendelkezésekre álló adatok szerint minden bizonnyal nem genotoxikus hatású. Mivel elképzelhető, hogy az immunuszuppresszív hatáson túl direkt, epigenetikus mechanizmusok is szerepet játszanak, megvizsgáltuk, hogy az általunk használt tesztrendszerben okoz-e az egyszerű ciklosporin-kezelés korai géneexpresszió-változásokat. A vizsgált szervek közül (thymus, csontvelő, nyirokcsomó, tüdő, vese, máj, lép) emelkedett géneexpressziókat a thymusban, nyirokcsomókban, lépben és igen kis mértékben a májban találtunk. A méréseket a kezelést követő 6. 12. 18. és 24. órában végeztük. Lényeges expresszió-emelkedést az *N-ras* génnél találtunk, a thymusban a 6-18 óra között, míg a nyirokcsomókban a 12. órától. Mindkét szervben átmeneti emelkedést mutatott még a *c-myc* gén expressziója, illetve a nyirokcsomókban a *c-p16/ret* gén a 24. órában. Jelen vizsgálatunkban tehát igazoltuk, hogy a korai géneexpresszió-változások nem genotoxikus vegyületek hatásainak monitorozására is alkalmasak. 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 tranziensnek 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. 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, „high-risk” populációk azonosítására, és a prevenció hatékonyságának monitorozására.

VIII. 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. 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. Az emelkedett *N-ras* és *p53* géneexpressziót mutató személyek száma az alábbi volt:

	<i>N-ras</i>	<i>p53</i> *
Exponáltak	11	20
Nem exponáltak	7	2

* $p < 0.05$

A *p53* tekintetében statisztikailag is szignifikáns összefüggés azt mutatta, hogy az alkalmasan megválasztott géneexpresszió-változások humán viszonylatban is használhatók potenciálisan karcinogén expozíció jelzésére. A gyakorlati alkalmazást tekintve nem valószínű, hogy az ilyen típusú géneexpresszió-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.

IX: A géneexpresszió-változások akkor lehetnek a daganatkialakulás kockázatának valid biomarkerei, ha magában a daganatban is találunk emelkedett géneexpressziókat, és ezeket kapcsolatba tudjuk hozni a korábban – még daganatmentes szervben – tapasztalt expresszió-változásokkal. A helyzetet nehezíti, hogy a daganatok szövettani szerkezete gyakran heterogén, és egyes genetikai jellemzőket – pl. pontmutációk előfordulását – csak a daganat bizonyos területein vagy a sejtek egy részében lehet kimutatni. 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 áll rendelkezésre, másrészt pedig azért, mert a glioblastomáknál nem ritka a szövettani heterogenitás, az elkülönült „high-grade” és „low-grade” területek jelenléte a daganaton belül. A vizsgálathoz műtéti úton eltávolított agytumороkból – a DOTE Idegsebészeti Klinika anyagából – származó mintákat használtunk fel. A géneexpresszió-vizsgálatok eredményeit a következő táblázat mutatja:

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

Ebben a vizsgálatban sikerült igazolni, hogy különböző agytumorkban a *H-ras*, *N-ras* és *c-myc* gén overexpresszált lehet. Beigazolódott az is, hogy egyes tumork 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. 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 stimuluskat az itt található sejtek számára.

X. A génamplifikációk, mint prognosztikus biomarkerek jelentőségét a DOTE Pathologiai Intézettel kollaborációban vizsgáltuk, gyomorrákos (n=26), vastagbél-daganatos (n=20) és világossejtes veserákos (n=36) betegek csoportjaiban. A *c-myc* gén amplifikációjának meglétét, illetve mértékét vetettük össze a betegek klinikai állapotával, a daganat TNM stádiumával, grádusával, lokalizációjával. Mind gyomorrákos ($r=0.56$, $p<0.01$), mind vastagbélrákos ($r=0.51$, $p<0.05$) betegeknél statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk a távoli metasztázisok meglétére és a *c-myc* amplifikáció mértéke között. A vastagbél-daganatos betegek között a génamplifikáció mértéke további korrelációt mutatott a betegség súlyosságával is ($r=0.47$, $p<0.05$), megerősítve a hipotézist, miszerint a *c-myc* amplifikációt mutató daganatok malignusabb, agresszívebb fenotípusúak. Mivel a világos sejtes veserák etiológiájában a *K-ras* aktiváció szerepel, a *c-myc* génen kívül a *K-ras* amplifikációkat is vizsgáltuk, és 6 esetben találtunk is *K-ras* amplifikációt. A *K-ras* amplifikáció két paraméterrel mutatott szignifikáns korrelációt, a szövettani grádussal ($r=0.43$, $p=0.017$) és a tumormérettel ($r=0.41$, $p=0.016$). Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a *K-ras* gén amplifikációja a daganat progressziójával együttjáró genetikai történés.

V. Az elért új eredmények összefoglalása

- 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 – tudomásunk szerint a p53, a NAT2 és a GSTT1 enzim viszonylatában ilyen hazai vizsgálatok még nem történtek. 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.
- 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 végbél-daganatos betegek között, mint a kontroll csoportban. Ha a három polimorfizmust egyidejűleg vizsgáltuk, azaz a mindhárom „high-risk” allélt (CYP2E1 c2, CYP1A1 1le, GSTM1 0) hordozó személyek kockázatát számítottuk ki, akkor ez lényegesen magasabb volt a kontrollokénál. Sikerült tehát a metabolizáló enzimek „high-risk” alléljei közötti kölcsönhatást igazolni, és bizonyítani, hogy az önmagukban esetleg még nem mérhető kockázatemelkedést okozó allélek együttes jelenléte a daganatkialakulás kockázatát szignifikánsan fokozza.
- 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 végbél-daganatok – 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” alléleket hordozóké. Ez a hipotézis még további vizsgálatokat igényel.
- 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 húsokat tartalmazó étrendet alkalmaztunk, a metabolizáló enzimek közül pedig a GSTM1 és a NAT2 polimorfizmusát vizsgáltuk. Ez a „diéta” fokozta a bélnyálkahártya sejtjeiben Comet-assay-vel mérhető egyes lánc törések mértékét, de a növekedés a „low-risk” genotípusúakban nem volt statisztikailag szignifikáns. Mind a NAT2 rapid acetilálóknak, mind a GSTM1 0 genotípusúakban („high-risk” allélek) azonban az expozíció szignifikánsan emelkedett mértékű DNS-károsodásokat indukált. A szignifikáns hatás kiatakításához 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-p16/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 feltevélezt, miszerint ez a daganat rosszabb prognózisának jele. Colorectalis daganatokban a *c-my* amplifikáció gyakoribb volt a távoli metasztázist adó esetekben.

VII. A disszertációhoz kapcsolódó saját publikációk

1. Kiss I., Ember I.: Kemilumineszcens reakciók alkalmazása génexpressziós 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., Herczeg 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.: Cytostaticus 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 szuppresszor gén vizsgálatok etilén-oxid exponált populációban. *Kórház- és Orvostechika*. 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. Koncz A., Varga I., Kiss I., Ember I.: Génexpresszió-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. Málóvics: 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. Nowrasteš, 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. Nowrasteš, 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. Csécséi, 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. Nowrasteš: 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 carcinómában. *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 *Anticancer Research*. 2000. 20: 1695-1702.
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 elfogadva*.

Impakt faktoral rendelkező folyóiratban megjelent absztraktok

1. I. Kiss, P. Kertai, Cs. Varga and I. Ember: Early cyclosporin effect on oncogene action. *Anticancer Research*. 12: 1811. 1992.
2. I. Kiss, I. Ember, E. Dezsényi, Gy. Csécséi: Activation of different oncogenes in malignant brain tumors. *Cancer Detection and Prevention*. 17: 97. 1993.
3. I. Ember, I. Kiss, Cs. Varga, P. Kertai: Early effect of cyclophosphamide on oncogene action *in vivo*. *Cancer Detection and Prevention*. 17: 112. 1993.
4. I. Ember, I. Kiss: Molecular epidemiological study on ethylene oxide exposed population. *The European Journal of Cancer*. 38: S3. 1994.
5. L. Kozma, Sz. Szakáll, I. Kiss and I. Ember: Amplification of c-myc oncogene in colorectal cancer. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 33: 297. 1995.
6. I. Kiss and I. Ember: Gene expression during differentiation in a myelomonocytic human leukemic cell line. *Cell Proliferation*. 28: 196. 1995.
7. I. Kiss and I. Ember: Lectin effect on oncogene expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Research*. 15: (5A) 1634-35. 1995.
8. I. Ember and I. Kiss: The role of carcinogen induced early gene events during carcinogenesis. *Anticancer Research*. 15: (5A) 1821. 1995.
9. I. Ember, I. Kiss: *In vivo* oncogene expression changes due to environmental carcinogens. *International Journal of Oncology*. 9: 852. 1996.
10. 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.
11. I. Kiss and I. Ember: Molecular epidemiology of the malignant gastrointestinal diseases. *Digestive Diseases and Sciences*. 41: 434. 1996.
12. I. Kiss, J. Sándor, G. Pajkos, I. Ember: Influence of genetic polymorphisms on colon cancer susceptibility. *Cancer Detection and Prevention*. 20: 533-534. 1996.
13. 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.
14. 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.
15. 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

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., Csécséy 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-molecular epidemiological 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 Fejlődésbilógiai 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. Nordwijkerhút, Hollandia, 1995. June 18-23.
20. Kozma L., Szakáll Sz., Kiss I., Ember I.: C-myc onkogén amplifikációja kolorektális karcinómában. 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 nyelődcső-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. szeptember 4-6.
39. Kiss I., Sándor J., Ember I.: A daganatok megelőzésének új távlatai: metabolizáló enzimek polimorfizmusai. Magyar Higiénikusok Társasága 29. Vándorgyűlés. Balatonföldvár, 1997. szeptember 24-26.
40. Ember I., Kiss I., Málóvics 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. október 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. október 16-18.
46. Kiss I., Sándor J., Pajkos G., Ember I.: Metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusai 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 Hétvége. 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. Hajdú, 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. október 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 hórgörákban. Magyar Onkológusok Társasága XXIII. kongresszusa. Budapest, 1999. november 12-14.
61. I. Ember, I. Kiss, Z. Gyöngyi: Onco and suppressorgene expression is a good biomarker for early detection of chemical carcinogenesis. Conference on Screening and Early Detection of Cancer. Vienna, 1999. november 18th -19th
62. Kiss I., Sándor J., Ember I.: Metabolizáló enzimek genetikai polimorfizmusai 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.