

Egészségtudományi Doktori Iskola

Egészségtudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem

Iskolavezető: Prof Dr. Kiss, István MD, Ph.D., DSc.



**KUTATÁS A MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIA  
ALKALMAZÁSÁRÓL A RÁK ELŐREJELZÉSÉBEN ÉS  
PROGNÓZISÁBAN**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Lu Zhang

Programvezető: Prof. Dr. Kiss, István

Témavezető: Prof. Dr. Kiss, István

Pécs, 2024

## 1 Bevezető

A molekuláris járványtan olyan terület, amely integrálja a molekuláris biológiát és az alapvető epidemiológiát. A biológiai útvonalban részt vevő biomarkereket és a betegségek kockázatával kapcsolatos specifikus géneket vezeti be az epidemiológiába, hogy felismerje a betegségek okát, kockázati tényezőit, a megelőzését, sőt a kezelését is. Hangsúlyt helyez a betegségek kialakulásához vezető genetikai, környezeti és egyéb tényezők közötti kölcsönhatásokra. A rák, betegségek olyan csoportja, amelyet a gyorsan és ellenőrizetlenül létrejövő és más szervekre áttérjedő kóros sejtek okoznak. A világon ez a második vezető halálozási ok. A rákot genetikai és környezeti tényezők kombinációja okozza.

A molekuláris epidemiológia eszközöket biztosít e tényezők közötti kölcsönhatás megértéséhez. A "hagyományos epidemiológiától" eltérően, amely az idő, a hely és a személy körül forog, a molekuláris epidemiológia figyelmet fordít a betegségekkel kapcsolatos biomarkerek - például DNS, transzkripció (átírási) faktorok, RNS, sejtfelszíni receptorok, enzimek, sőt metabolitok - keresésére, majd ezeket felhasználja a betegségek populációkon belüli mechanizmusainak magyarázatára. Egészen a rák kialakulásának kockázatától kezdve, a rák molekuláris epidemiológiai kutatásában használt biomarkerek csoportosíthatók az alábbiak szerint: a kitettség jelei, belső dózis jelzők, biológiailag hatékony dózis jelzők, korai biológiai hatásjelzők, megváltozott szerkezet/ funkció jelei, prognózis biomarkerei, betegség jelei. Ezek a markerek fontos szerepet játszanak a betegségek korai felismerésében, diagnózisában, stádiumbeosztásában, kezelésében és prognózisában.

Azonban új terület jellegéből fakadóan továbbra sem világos, hogy a molekuláris epidemiológiát hogyan használják fel a konkrét gyakorlati vizsgálatokban, és hogyan segít az okok, valamint a kockázati tényezők feltárásában és végső soron a védekezésben. Ezért e tanulmány célja, hogy két gyakorlati tanulmányon keresztül mutassa be, a molekuláris epidemiológia jelenlegi állását a rákkutatásban: "Az

egynukleotid-polimorfizmusok és a bőrrák-érzékenység közötti kapcsolat" és "A hidrogéngáz tüdőrákra gyakorolt kezelési hatása" mentén.

## **2 A hidrogén gáz terápia hatása tüdőrák esetén -- Linc-PINT és LincRNA-p21 biomarkerekként**

### **2.1 Háttér**

A tüdőrák (LC), mint az egyik leggyakoribb rákos megbetegedés, világszerte megnövekedett megbetegedési és halálozási arányt okoz. A hosszú intergenikus nem fehérje kódoló RNS p53-indukált transzkriptum (LINC-PINT) és a LincRNS-p21 TP53-indukált transzkriptumok. Megvizsgálták, hogy a LINC-PINT és a lincRNS-P21 megjelenése csökken rosszindulatú rák esetén. A molekuláris hidrogén (H<sub>2</sub>) egy új orvosi gáz, amelyet szelektív antioxidánsként használnak a gyulladáscsökkentő és az anti-apoptózis funkciók modulálásában. A H<sub>2</sub> szerepet játszik az LC kezelésében is. Ezért e tanulmány célja a H<sub>2</sub> kezelési hatásának feltárása a tüdőráksejtekben a LINC-PINT és a lincRNS-P21 megjelenésének azonosításával.

### **2.2 Módszer**

Az elektrokémiai vízkészüléket hidrogéngáz előállítására használtam. qRT-PCR-t alkalmaztam a LINC-PINT és a lincRNS-P21 megjelenésének meghatározására a tüdőrákos sejtekben. Egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) és lineáris regressziót végeztünk a több csoport közötti különbségek és összefüggések elemzésére.

### **2.3 Eredmények**

#### **2.3.1 Lehetséges befolyásoló tényezők vizsgálata**

Annak érdekében, hogy a H<sub>2</sub> gáz áramlása stabil legyen, megvizsgáltuk a H<sub>2</sub> és az idő közötti kapcsolatot. A termelt hidrogén térfogata lineáris kapcsolatban állt az idővel

( $Y=32,78+1,55X$ ,  $R^2=97,60\%$ ,  $P<0,05$ ). Emellett az ANOVA eredmény azt mutatta, hogy a doboz három rétegének H<sub>2</sub>-koncentrációja között nem volt statisztikai különbség ( $F=0,589$ ,  $P>0,05$ ). Így megerősítettük, hogy a petri csésze középső és felső rétegei azonos koncentrációjú hidrogéngáznak voltak kitéve.

### 2.3.2 A H<sub>2</sub> koncentráció hatásai a lincRNS-k kifejeződésére

A tüdőrákos sejteket 3 különböző koncentrációjú (0%, 5% és 10%) H<sub>2</sub> gázzal kezelték három különböző időtartamban (2H, 3H és 3H30). A LINC-PINT kifejeződési szintje szignifikánsan korrelált a növekvő H<sub>2</sub>-koncentrációval, a 0%-tól (kontrollcsoport) az 5%-os és 10%-os koncentrációig a 2H30 és 3H időcsoportokban ( $R_{2H30}=0,52$ ,  $R_{23H}=0,57$ , mindkettő  $P<0,05$ ). A kifejeződési szintek és a H<sub>2</sub>-koncentrációk közötti pozitív kapcsolat a lincRNS-P21 kifejeződése esetében is megfigyelhető volt a 2H30 időcsoportban ( $R^2=0,88$ ,  $P<0,01$ ). Ezzel szemben a LINC-PINT expressziója szignifikáns negatív korrelációt mutatott a H<sub>2</sub>-koncentrációval a 3H40 időcsoportban ( $R^2=0,81$ ,  $P<0,01$ ).

### 2.3.3 A kezelés idejének hatása a linc-RNA kifejeződésre

A LINC-PINT kifejeződési szintje az 5%-os H<sub>2</sub> és a 10%-os H<sub>2</sub> csoportban ellentétes tendenciát követett a különböző hosszúságú kezelés után, azonban egyik tendencia sem volt statisztikailag szignifikáns ( $F_{5\%H_2}=1,60$  és  $R_{25\%H_2}=0,78$ ,  $F_{10\%H_2}=3,64$  és  $R_{210\%H_2}=0,34$ , mindegyik  $P>0,05$ ). A lincRNS-P21 expressziója az idő múlásával csökkent ( $F_{5\%H_2}=13,54$  és  $R_{25\%H_2}=0,66$ ,  $F_{10\%H_2}=28,94$  és  $R_{210\%H_2}=0,81$ , mindegyik  $P<0,01$ ) mind az 5%-os, mind a 10%-os H<sub>2</sub>-koncentrációjú csoportokban.

## 2.4 Eredmények

Tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, amely azonosítja az lncRNS-ek lehetséges szerepét biomarkerként a tüdőrákos sejtekben a hidrogéngáz használatát követően. Eredményeink azt mutatták, hogy a hidrogén nemcsak a sejtek funkcióit befolyásolta DNS- és fehérjeszinten, hanem az lncRNS-expressziójukat is. Továbbá azt

találtuk, hogy a LINC-PINT kifejeződése nőtt a H<sub>2</sub>-gáz növekvő koncentrációjával, 2 óra harminc perc és három óra elteltével. Továbbá, a LINC-PINT-hez hasonlóan a lincRNS-P21 expresszióját 5%-os H<sub>2</sub> gáz használata után találtuk a legalacsonyabbnak, amelyet a 10%-os, majd a 0%-os H<sub>2</sub> követett, 2 óra és 30 perc időtartamban.

A TP53 által indukált LINC-PINT transzkriptumot többféle emberi szövetben is kimutatták (1). A LINC-PINT autoregulatív módon negatívan modulálja a TP53-at azáltal, hogy a sejtciklus leállításának szabályozójaként és DNS-károsodás esetén túlélést elősegítő molekulaként működik. A lincRNS-P21 szintén tumorszuppresszor (2), amelyről kimutatták, hogy kompetitív módon kötődik a Mouse double minute 2-höz (MDM2), hogy növelje a TP53 transzkripció aktivitását (3). Így a LINC-PINT és a lincRNS-P21 közvetlenül és közvetve szabályozza a sejtproliferációt, a migrációt, az apoptózist és a Warburg-effektust (4), és a sejtnövekedéshez és a proliferációhoz is elengedhetetlen (5).

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a H<sub>2</sub>-gáz felfelé szabályozta a LINC-PINT és a lincRNS-P21 expresszióját a tüdőráksejtekben, amiről korábban szintén beszámoltak (6). Például egy LC-betegek bevonásával végzett páciens alapú vizsgálat azt jelezte, hogy a normális szövetekhez képest a lincRNS-P21 expressziója csökkent a tumorszövetben (7). A lincRNS-P21 ezen lefelé szabályozását az NSCL-ben Samaneh Talebi tanulmányában is leírta (8). Dongchang Wang és munkatársai arról számoltak be, hogy a H<sub>2</sub> gázzal történő kezelés gátolta az A549 és H1975 sejtek növekedését, migrációját, invázióját és apoptózisát a kromoszóma-kondenzáció egyik szabályozójának lefelé történő szabályozásával (9).

Érdekes módon azonban azt találtuk, hogy a leghosszabb ideig (3 óra 40 perc) H<sub>2</sub> gázzal kezelt sejtekben a LINC-PINT expressziós szint csökkent. Vizsgálatunk azt is kimutatta, hogy a lincRNS-P21 expressziója az 5%-os és 10%-os H<sub>2</sub> kezelési csoportokban az idő múlásával csökkent. Eredményeinket alátámasztják Castellano és munkatársai. Tanulmányuk arról számolt be, hogy a rosszabb prognózisú tüdőrákos betegeknél magasabb lincRNS-P21-szintek voltak, mint a jobb prognózisúaknál (7).

A lincRNS-p21-ről kimutatták, hogy hipoxiára reagáló lincRNS, amely hipoxiás körülmények között a HIF-1 $\alpha$ -hoz és a VHL-hez kötődve fontos szerepet játszik a glikolízisben (10). A Warburg-effektus a glükóz-anyagcsere zavart formájaként definiálható, amely oxigén jelenléte ellenére fokozott glükózfogyasztással és laktáttermeléssel jár, ami a daganatokra és a rosszindulatú fejlődésre jellemző (11). Ez a metabolikus jellemző a Warburg-hatás, amelyről kimutatták, hogy hozzájárul a tüdőrák rosszindulatú daganatainak inváziójához és metasztázisképződéséhez is (12,13). Korábbi vizsgálatokban a LINC-PINT negatív korrelációját mutatták ki a HIF-1 $\alpha$ -val, egy oxigénérzékelő transzkripciós faktorról a gyomorráksejtekben (14). Így nagy valószínűséggel a LINC-PINT és a lincRNS-P21 is részt vesz a tüdőráksejtek glükózanyagcserejének zavarában (15). Ezen adatok alapján tehát azt feltételezzük, hogy a hidrogénnel történő kezelés a tüdőráksejtekben Warburg-effektust idézhetett elő, ami viszont a LINC-PINT és a lincRNS-P21 csökkent expresszióját eredményezte. Hipotézisünk ellenőrzéséhez azonban további kutatások indokoltak.

## **2.5 Következtetés**

Összefoglalva - bár a LINC-PINT és a lincRNS-P21 szintje csökkent a viszonylag hosszú H<sub>2</sub> csoportokban - vizsgálatunk azt mutatta, hogy a LINC-PINT és a lincRNS-P21 expressziója a H<sub>2</sub> gáz növekvő koncentrációjával felfelé szabályozódott mind a kétórás, mind a harminc perces, mind a háromórás kezelés után.

Így megállapítható, hogy a hidrogéngáz viszonylag rövid használati idő után felfelé szabályozta a LINC-PINT és a lincRNS-P21 kifejeződését a nem kissejtes tüdőráksejtekben.

## **2.6 Vizsgálati korlátok**

Bár minden kísérletet háromszor ismételtünk meg, az ismétlések száma továbbra is a vizsgálat egyik fő korlátját jelentheti. Másodszor, a H<sub>2</sub> kezelési idő 2 óra 30 perc és 3 óra 40 perc között mozgott, ami nem tekinthető hosszú időintervallumnak. Így

eredményeink eltérhettek volna, ha hosszabb kezelési időt alkalmazunk.

### **3 Példa a rák kockázatának értékelésére: kapcsolat a single és nukleotid**

#### **polimorfizmusok és a bőrrákra való hajlam között**

##### **3.1 Bevezetés**

A kockázatfelmérés a rákos megbetegedésekkel nem rendelkező személyeknél a rák kialakulásának legkorábbi bizonyítéka. Az egynukleotid-polimorfizmusok (SNP-k) beavatkoznak bizonyos gének működésébe, és így befolyásolhatják a bőrrák kialakulásának valószínűségét. Az SNP-k és a bőrrák közötti összefüggésnek azonban nincs statisztikai ereje. Ezért e tanulmány célja az volt, hogy hálózati metaanalízis segítségével azonosítsa a bőrrákra való hajlamban szerepet játszó génpolimorfizmusokat, és meghatározza az SNP-k és az SC-kockázat közötti kapcsolatot.

##### **3.2 Módszer**

A PubMed, Embase és Web of Science adatbázisokban olyan cikkeket kerestem, amelyek kulcsszóként az "SNP" és a különböző típusú SC-eket tartalmazzák, 2005 januárja és 2022 májusa között. Az elfogultság megítélésére a Newcastle-Ottawa-skálát használtuk. A vizsgálatokon belüli és a vizsgálatok közötti heterogenitás becslésére esélyhányadosokat (OR) és azok 95%-os konfidenciaintervallumait (CI) határoztuk meg. Metaanalízist és hálózati metaanalízist végeztünk az SC-vel összefüggő SNP-k azonosítására. Az egyes SNP-k P-pontszámát összehasonlítottuk, hogy megkapjuk a valószínűségi rangsort. A rák típusa szerint alcsoportelemzéseket végeztem el.

##### **3.3 Eredmények**

###### **3.3.1 Irodalomkutatás eredményei**

Az irodalomkutatás kezdetben 3575 tanulmányt azonosított a PubMed, Embase és Web of Science adatbázisokból. A keresést 2022. május 2-án fejeztem be. A címek és összefoglalók alapján 368 tanulmányt és 232 teljes szövegű kéziratot szűrtem át. A befogadási kritériumoknak 59 tanulmány felelt meg, és bekerült a hálózati metaanalízisbe. Egy cikket elfogultság miatt kizártam, az alábbiakban kifejtettek eredményeképpen.

### 3.3.2 A tanulmányok jellemzői és elfogultságai

2005 és 2022 között 60 tanulmányt tettek közzé. A kaukázusi vagy mongoloid etnikumokat vizsgáló tanulmányok bevonásra kerültek. Az öt csillagnál alacsonyabb NOS-pontszámmal rendelkező tanulmányokat kizártam. Végül 59 cikket vontam be a szisztematikus áttekintésbe és metaanalízisbe.

### 3.3.3 Páros metaanalízis

Közvetlen metaanalízist végeztem a 275 SNP és az SC kockázata közötti összefüggés meghatározására. A 47 vizsgálatból származó 72 SNP szoros összefüggést mutatott az SC-vel az allélmodellt alkalmazó vizsgálatokban (A vs. B), míg a domináns modellt alkalmazó 31 vizsgálatból származó 52 SNP esetében szignifikáns összefüggést találtak (AA+AB vs. BB). Továbbá a recesszív modell (AA vs. AB+BB) alapján 35 tanulmányból származó 77 SNP állt kapcsolatban az SC-vel. A kimutatott SNP-eket tovább elemeztem a diagnosztikai pontosság szempontjából.

A SUCRA szerint az allélmodell alkalmazható a dominancia feltárására. Ezután a domináns modellt választottam az SC diagnosztizálására szolgáló genotipizálási modellnek.

### 3.3.4 Az allélmodell (A vs. B)

Az allél modellben az rs16891982 (G vs. C, kombinált OR [cOR]=2,74, 95% CI [2,20, 3,40]), rs885479 (G vs. A, cOR=1,46, 95% CI [1. 06, 2,01]), rs1544410 (G vs. A,



cOR=1,19, 95% CI [1,06, 1,34]), rs731236 (T vs. C, cOR=1,11, 95% CI [1,00, 1,23]), és az rs25487 kisebb alléljai (G vs. C, cOR=1,11, 95% CI [1,00, 1,23]), valamint az rs25487 kisebb alléljai (G vs. A, cOR=1,19, 95% CI [1,06, 1,34]). A, cOR=0,92, 95% CI [0,85, 0,99]), rs4911414 (G vs. T, cOR=0,85, 95% CI [0,75, 0,96]), rs1695 (W vs. M, cOR=0,79, 95% CI [0,65, 0,95]) és rs2228570 (vad típusú allél vs. mutáns allél, cOR=0,79, 95% CI [0,71, 0,88]) legalább két vizsgálatban szignifikánsan összefüggött az SC-vel. Az összesített P-érték minden SNP esetében kisebb volt, mint 0,05.

### 3.3.5 A domináns modell (AA+AB vs. BB)

Az eredmények azt mutatják, hogy azok, akik homozigóták és heterozigóták voltak a fő allélokra: rs16891982 (GG+GC vs. CC, cOR=3,72, 95% CI [1,66, 8,35]), rs494379 (TT+TC vs. CC, cOR=2,62, 95% CI [1,96, 3,49]), rs514921 (AA+AG vs. GG, cOR=2,14, 95% CI [1,67, 2,75]), rs1144393 (AA+AG vs. GG, cOR=1,48, 95% CI [1,19, 1,84]), rs11615 (AA+AG vs. GG, cOR=1,41, 95% CI [1,02, 1,95]) és rs498186 (TT+TG vs. GG, cOR=1,35, 95% CI [1,10, 1,65]) esetében magasabb volt a SC kialakulásának kockázata, mint a kisebbségi allélokra homozigóta személyeknél. Ezzel szemben az rs25487 (GG+GA vs. AA, cOR=0,85, 95% CI [0,72, 1,00]) és az rs1805007 (CC+CT vs. TT, cOR=0,42, 95% CI [0,19, 0,91]) kisebbségi allélra homozigóta egyének szignifikánsan összefüggésbe hozhatók az SC-re való fokozott fogékonysággal.

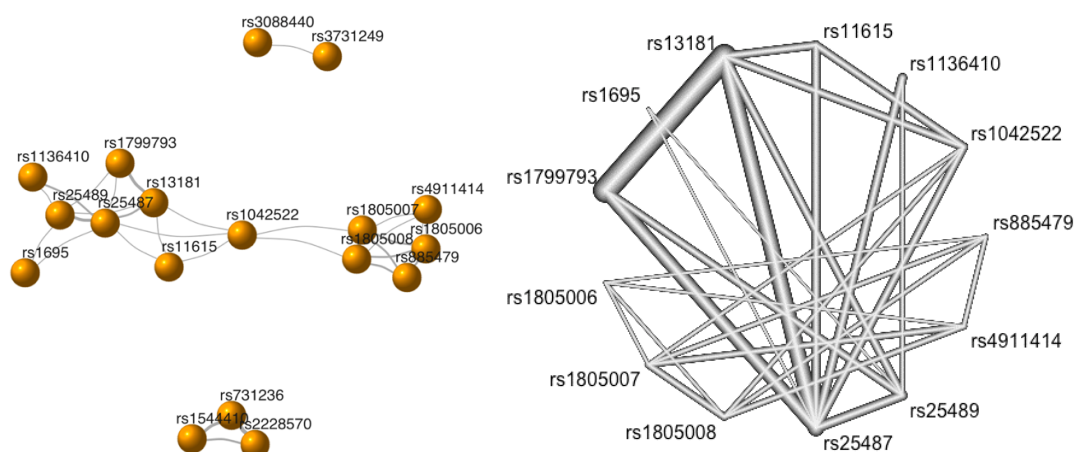
### 3.3.6 Alcsoport elemzés

A három genotípus mindegyikére vonatkozóan elvégeztük a kovariáns regressziós elemzést. Az eredmények azt mutatták, hogy a rák típusa nem volt a heterogenitás forrása a vizsgált modellekben.

### 3.3.7 Hálózati bizonyíték

### 3.3.7.1 Az allélmodell

A hálózati diagram az egyes SNP-párok durva összehasonlítását mutatja (1. ábra). A csomópont egy SNP-t jelöl, a mérete pedig a tanulmányok számát. A csomópontok közötti kapcsolatok egy pár összehasonlítást jelentenek, vastagságuk pedig a közvetlen összehasonlítások számát jelzi. Amint az 1a. ábrán látható, három olyan alcsoport volt, amelyek között nem volt kapcsolat. Emellett a redundancia elkerülése érdekében az egy tanulmányból származó SNP-k hálózatát tanulmányunkban töröltük. Így az allélmodell NMA-ját két csoportra osztottuk: alcsoport (beleértve az rs1544410, rs2228570 és rs731236) és a második alcsoport (beleértve az rs1042522, rs1136410, rs11615, rs13181, rs1695, rs1799793, rs1805006, rs1805007, rs1805008, rs25487, rs25489, rs4911414 és rs885479) (1b. ábra).



a. Hálózati ábra az összes alcsoport SNP-éről

b. Hálózati ábra az összes alcsoport

SNP-éről a második alcsoportban

Ábra 1 A hálózati bizonyíték ábra az allél modellben lévő egyedi nukleotid polimorfizmusokról (A vs. B).

Az első alcsoportban az rs731236 vs. rs2228570 SNP-k mutatták a legerősebb negatív korrelációt az SC kockázatával (standardizált átlagos különbség (SMD) OR=-0,08, 95% CI [-0,18, 0,02]). Az SNP-k közötti korrelációk P-értékei azonban az egyes

alcsoportban 0,05 felett voltak.

Hasonlóképpen, a legnagyobb közvetlen összevont hatásmérettel rendelkező összehasonlítás a kettes alcsoportban az rs4911414 vs. rs1805006 (SMD OR=-2,94, 95% CI [-2,48, -3,40]) volt, amelyet az rs13181 vs. rs25489 (SMD OR=-2,35, 95% CI [-2,54, -2,16]) összehasonlítás követett.

Továbbá, a második alcsoportban a közvetlen és közvetett bizonyítékok negatív korrelációt mutattak az rs1042522 vs. rs25487, rs1136410 vs. rs25489, rs11615 vs. rs13181, rs11615 vs. rs25487, rs13181 vs. rs1799793, rs13181 vs. rs25487, rs1805007 vs. rs1805006 és rs1805007 vs. rs885479. Mivel azonban az egyes összehasonlítások közvetett bizonyítottsági aránya (azaz az egyes becsült összehasonlítások átlagos útvonalhossza) kisebb volt, mint 2 (16), a fent említett összehasonlítások mindegyike a közvetlen bizonyítottság irányát követte.

A bőrrákkal való szignifikáns összefüggés legnagyobb esélyével rendelkező SNP-k kiválasztásához a P-értékeket rangsoroltam ami az 1. táblázatban látható. Az SNP rs2228570 (P-érték=0,85) az első helyen állt az első alcsoportban az allélmodellben, az SNP rs13181 pedig a legmagasabb P-értéket kapta a második alcsoportban (P-érték=0,94).

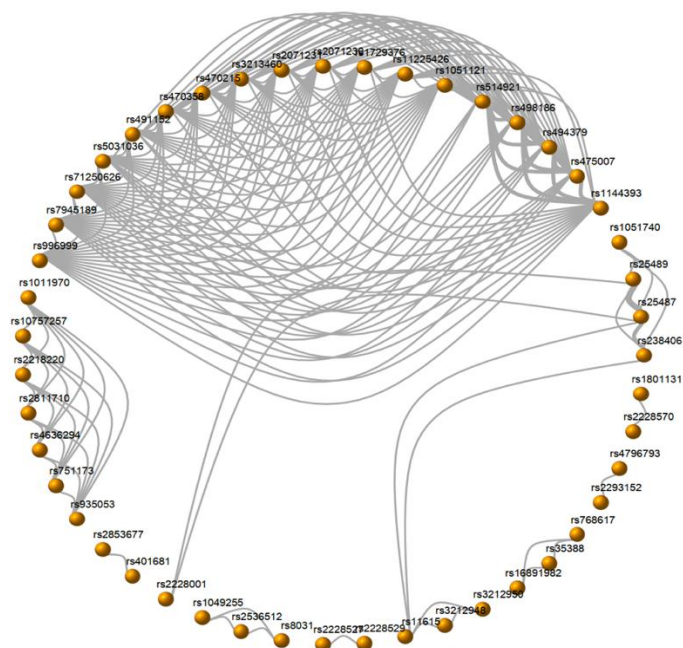
Táblázat 1 Az SNP-k P-értékének rangsora az allél modellben minden alcsoportban

Rangsor	Alcsoport 1	P-érték	Alcsoport 2	P-érték
1	rs2228570	0.85	rs13181	0.94
2	rs1544410	0.47	rs1799793	0.90
3	rs731236	0.18	rs25487	0.88
4			rs11615	0.77
5			rs1042522	0.64
6			rs1695	0.57
7			rs4911414	0.54
8			rs1136410	0.41
9			rs1805007	0.33

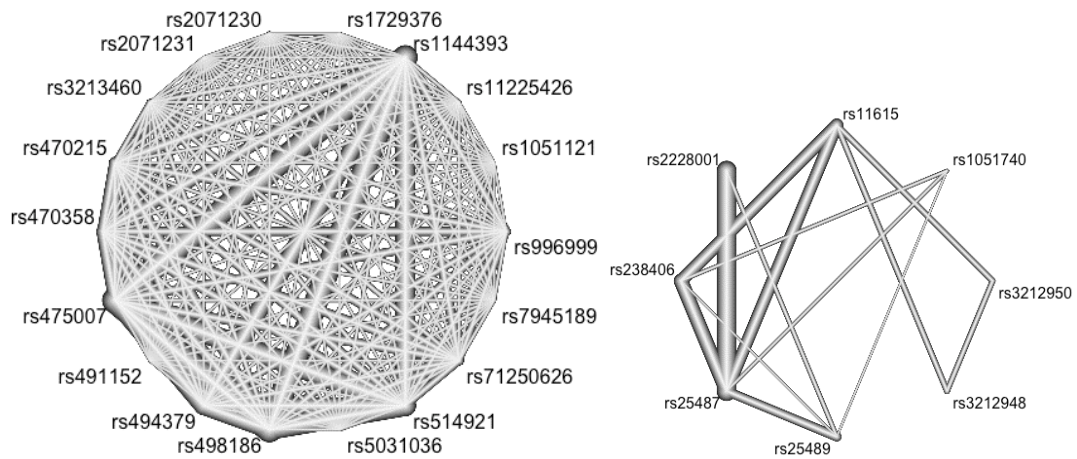
10	rs1805008	0.24
11	rs25489	0.19
12	rs885479	0.08
13	rs1805006	0.00

### 3.3.7.2 A domináns modell

A 2a. ábrán csak két alcsoport felelt meg az NMA követelményeinek. Az első alcsoportba az rs1051121, rs11225426, rs1144393, rs1729376, rs2071230, rs2071231, rs3213460, rs470215, rs470358, rs475007, rs491152, rs494379, rs498186, rs5031036, rs514921 tartozott, rs71250626, rs7945189 és rs996999 (2b. ábra), míg a kettes alcsoportba az rs1051740, rs11615, rs2228001, rs238406, rs25487, rs25489, rs3212948 és rs3212950 (2c. ábra) tartozott.



a. Az összes alcsoportban található SNP-k hálózati ábrája



b. Az SNP-k hálózati ábrája az 1. alcsoportban  
alcsoportban

c. Az SNP-k hálózati ábrája a 2.

Ábra 2 Az egynukleotid-polimorfizmusok (SNP-k) hálózati evidencia ábrája a domináns modellben (AA+AB vs. BB). a. hálózati térkép 47 SNP-vel; b. Az első alcsoport hálózati térképe 18 SNP-vel; c. A második alcsoport hálózati térképe 8 SNP-vel.

Az első csoportban nem volt ellentmondás a közvetlen és közvetett bizonyítékok között. A legerősebb pozitív összefüggések ebben az alcsoportban az rs475007 vs. rs1729376 és az rs475007 vs. rs2071231 összehasonlítása volt (mindkettő SMD hálózati OR=4,23, 95% CI [ 2,19, 6,25]). Ezeket követte az rs475007 vs rs491152 összehasonlítás, amely SNP-k negatívan korreláltak az SC kockázatával (SMD of network OR=-4,21, 95% CI [-6,24, -2,18]). Az rs494379 és az rs514921 összehasonlítása mutatta a legerősebb közvetett korrelációt (az indirekt OR SMD=11,52, 95% CI [-9,40, 32,44]).

A közvetlen és az indirekt bizonyítékok iránya eltérő volt az rs1144393 vs rs1051121, rs11225426 vs rs1144393, rs1144393 vs rs1729376, rs1144393 vs rs2071230, rs1144393 vs rs2071231, rs1144393 vs rs3213460, rs1144393 vs rs470215 összehasonlításokban, rs1144393 vs rs470358, rs1144393 vs rs491152, rs1144393 vs rs5031036, rs1144393 vs rs71250626, rs1144393 vs rs7945189, rs1144393 vs rs996999, rs470215 vs rs514921, rs470358 vs rs498186, rs475007 vs rs514921, rs498186 vs

rs514921, rs514921 vs rs71250626. Mivel azonban az egyes összehasonlítások közvetett bizonyítékaik aránya kisebb volt, a közvetlen bizonyítékok irányát követték.

A második alcsoportban az rs2228001 vs. rs25487 és az rs2228001 vs. rs25489 összehasonlításában közvetlen és közvetett bizonyítékokkal kapcsolatos ellentmondásokat találtam. Míg a közvetlen bizonyítékok aránya mind a két összehasonlítás esetében nagyobb volt, mint az indirekt bizonyítékoké. Ezért mind az rs25487, mind az rs25489 negatívan korrelált az rs2228001-gyel a hálózatelemzés után. Az rs238406 vs. rs25489 összehasonlításban volt a legerősebb kapcsolat (a hálózati OR SMD értéke=-2,17, 95% CI [-2,72, -1,61]).

Ahogy a 2. táblázatban látható, az rs475007-nek az első alcsoportban a legmagasabb a P-értéke (0,97), az rs238406-nak pedig a második alcsoportban a legmagasabb a P-értéke (0,97). Ezért a bőrrákkal legnagyobb valószínűséggel összefüggésbe hozható öt SNP csökkenő sorrendben az első alcsoportban a következő: rs475007, rs470358, rs498186, rs1144393, rs470215, a második alcsoportban pedig : rs238406, rs2228001, rs25487, rs11615, rs3212950.

Táblázat 2 Az SNP-k P-értékének rangsora minden alcsoportban

Rangsor	Alcsoport 1	P-érték	Alcsoport 2	P-érték
1	rs475007	0.97	rs238406	0.97
2	rs470358	0.92	rs2228001	0.87
3	rs498186	0.89	rs25487	0.62
4	rs1144393	0.84	rs11615	0.50
5	rs470215	0.79	rs3212950	0.41
6	rs514921	0.68	rs3212948	0.41
7	rs71250626	0.62	rs1051740	0.21
8	rs494379	0.59	rs25489	0.02
9	rs996999	0.58		
10	rs3213460	0.42		

11	rs2071230	0.27
12	rs7945189	0.27
13	rs11225426	0.26
14	rs5031036	0.26
15	rs1051121	0.17
16	rs491152	0.16
17	rs1729376	0.16
18	rs2071231	0.16

### 3.4 Eredmények

A páros meta-analízis közvetlen összehasonlításai és a hozzáadott közvetett összehasonlítások alapján tanulmányunk hálózati meta-analízist alkalmazott az egynukleotid-polimorfizmusok és a bőrrák közötti összefüggések összehasonlítására az allélmodell és a domináns modell segítségével. Hálózati metaanalízisünk két alcsoportot azonosított az egyes genetikai modellekben. Az SNP-eket a P-pontszámuk alapján rangsoroltuk, hogy kiválasszuk a legmegfelelőbb SNP-eket. Eredményeink azt mutatták, hogy az rs2228570 (FokI) kisebbségi allélja (T) és az rs13181(ERCC2) (C) a legmagasabb rangú SNP-k voltak, mind az első, mind a második alcsoportban, az allélmodellben. Másrészt, a domináns modellt használva, az rs475007 vad típusú és heterozigóta alléljai (AA+AT) az egyes alcsoportban és az rs238406 mutáns homozigóta allélja (AA) a kettes alcsoportban a legnagyobb valószínűséggel a bőrrákkal állt kapcsolatban.

Az rs2228570 (FokI) egynukleotid-polimorfizmus a D-vitamin-receptor (VDR) génben található. Ez az egyik leggyakoribb emberi VDR SNP az rs1544410(BsmI), rs7975232 (ApaI) és rs731236 (TaqI) mellett. A D-vitamin az ultraibolya B (UVB) sugárzás hatására D-vitaminná: 1,25(OH)2D3.1 metabolizálódik. Ez a metabolit a VDR ligandja, amely viszont a DNS-ben található D-vitamin-válaszelemekhez kötődve egy sor biológiai választ indít el a csontanyagcserében, az immunitásban, a sejtproliferációban és a differenciálódásban (17). Ezért az rs2228570-et nemcsak különböző

bőrbetegségekkel, például krónikus spontán csalánkiütéssel (CSU) (18), atópiás dermatitisszel (AD) (19) és leprával (20) hozták összefüggésbe, hanem különböző rákos megbetegedések, például emlőrák (21), petefészekrák (22), gyomorrák (23), májsejtes karcinóma (24), pajzsmirigyrák (25), hasnyálmirigyrák (26) és melanoma fokozott előfordulási kockázatával és rosszabb prognózisával is. Eredményeink összhangban vannak a korábbi, assay módszereket alkalmazó vizsgálatokkal (27). Például az assay-módszert alkalmazó Zeljic és munkatársai vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy az rs2228570 mutált genotípusa a vad típusú genotípushoz képest fokozott melanoma-kockázattal állt összefüggésben a kaukázusi populációban (27). Ebben a biosystem assay módszerrel végzett vizsgálatban azonban nem észleltek összefüggést az rs2228570 és a melanoma között (28).

Az rs13181 és rs238406 SNP-k az első és második helyen álltak a második alcsoportban mind az allél, mind a domináns modellben. Mindkét SNP allélja az ERCC2 (korábbi nevén XPD) génben található. Az ERCC2 polimorfizmusok ATP-függő DNS-helikáz aktivitással rendelkeznek, ami hatással lehet a DNS-javító funkciókra. Az ERCC2 hiánya xeroderma pigmentosum (XP), trichothiodystrophia (TTD) és Cockayne-szindróma (CS) kialakulásához vezet (29). Ez a megfigyelés magyarázhatja, hogy az rs13181 és az rs238406 miért hozható összefüggésbe rákos megbetegedésekkel, például tüdőrákkal (30), méhnyakrákkal (31), emlőrakkal, a fej és nyak laphámsejtes karcinómájával (32) és hólyagrakkal (33). Ezekkel az eredményekkel összhangban eredményeink azt mutatták, hogy az rs13181 minor allélja (C) és az rs238406 mutáns homozigóta allélja (AA) szignifikánsan összefüggésbe hozható az SC kockázatával. Kertatbs és munkatársai tanulmánya az rs13181 vad típusú alléljának magas gyakoriságáról számolt be előrehaladott melanomában (34). Ugyanakkor egy microarray chip módszerrel végzett vizsgálat, amely 1391 NMSC esetet és 2586 rákmentes kontrollt foglalt magában, nem talált szignifikánsan megnövekedett NMSC kockázatot a vad típusú rs13181 esetében (35). Továbbá egy metaanalízis megállapította, hogy az rs238406 mutáns homozigóta allélja (AA) pozitívan társult az idegrendszeri, az emésztőrendszeri, a genito-urinális és a légzőrendszeri rákok fokozott



kockázatával, de a bazálsejtes rákok nélkül (36).

A mátrix metalloproteinázok (MMP-k) a proteolitikus enzimek családjá, amelyek az extracelluláris fehérjék lebontása révén részt vesznek a sejtek mobilitásában, proliferációjában, differenciálódásában és apoptózisában (37). Az MMP1, egy szekretált enzim, amely fibrilláris kollagént hasít át, összefüggésbe hozható a rákos megbetegedésekkel, mivel elősegíti a rákos sejtek proliferációját, a tumor angiogenezisét és a vaszkulogenezist (38). Kutatásunk domináns modelljében az első alcsoport összes SNP-je az MMP1 génben helyezkedett el, és az SNP, amely a legnagyobb valószínűséggel kapcsolatba hozható az SC-vel, az rs475007 volt. Továbbá az rs475007 minor alléljának homozigotizációja csökkentette a bőrrák kockázatát. Hasonló eredményeket találtak Hongliang Liu vizsgálatában, amely arról számolt be, hogy az rs475007 fő alléljára homozigóta vagy heterozigóta betegeknél nagyobb valószínűséggel fordult elő nagyobb bőrdaganat (39).

### **3.5 Vizsgálati korlátok**

A technikai különbségek és az érzékenységbeli különbségek miatt elemzésünk csak a PCR genotípus kimutatási módszert alkalmazó tanulmányokat vette figyelembe, és kizárta a microarray kimutatásokat vagy a genom-széles körű asszociációs vizsgálatokat (GWAS). A GWAS-ok azonban sokkal nagyobb mintaméretet tesznek lehetővé, mint a PCR-vizsgálatok. Ezenkívül az RStudio és a StataSE szoftverek korlátai és a többszálú vizsgálatok összetettsége miatt a csak egyetlen cikkben közölt SNP-eket nem vettük be a végleges hálózati metaanalízisbe.

### **3.6 Jövőbeli lehetőségek**

Cikkünk szerint a FokI (rs2228570), ERCC2 (rs13181), MMP1(rs475007) és ERCC2 (rs238406) génekben mutációval rendelkezőknél nagyobb valószínűséggel alakult ki bőrrák. A diszpláziás naevusok (más néven atipikus anyajegyek) a rosszindulatú melanoma előfutárai és rizikófaktoraik (40). Nehéz azonban megkülönböztetni őket a

melanomáktól az átfedő jellemzők és a prediktív markerek hiánya miatt(41). Eredményeink tehát lehetőséget nyújthatnak a tünetmentes bőrrák korai felismerésére, ha a jövőben rutinszerű genetikai szűrést vezetnek be az általános populációban. Emellett vizsgálatunk eredményei értékes információkkal szolgálhatnak a döntéshozatalhoz is, amikor egy betegnél meghatározzuk a SC legjobb terápiás módját. Mivel például a FokI egy D-vitamin-receptor gén, és a D-vitamint védőfaktorak tekintik bizonyos rákos megbetegedések, például a bőrrák esetében (42,43), a D-vitamin-pótlás adjuváns terápiaként alkalmazható a rákos betegeknél. Ezért fontos a FokI gén (rs2228570) mutációval rendelkező SC betegek azonosítása, mivel ezek a betegek nem részesülnének adjuváns D-vitamin-terápiában.

Ezen túlmenően az SNP-párok között közvetlen és közvetett bizonyítékokat kaptunk a hálózatelemzés segítségével, ami bizonyos génmutációk közötti, eddig feltáratlan kapcsolatok lehetőségét vetette fel. Például az ERCC2 génmutációkról kimutatták, hogy közvetve növelik a SC kockázatát (44,45), és a melanocortin receptor 1 (MC1R), amely a melanocita-stimuláló hormon (MSH) receptorát kódolja, szintén a bőrrák kockázati tényezőjének bizonyult (46). Hálózati metaanalízisünk közvetett bizonyítékai azonban meglepő módon azt mutatták, hogy az ERCC2 (rs13181) negatív kapcsolatban áll az MC1R-rel (1805006, 1805007, 1805008 és rs885479). Ezért az ERCC2 és az MC1R közötti kapcsolat további kutatásokat tesz szükségessé, hogy meghatározzuk a SC fejlődésében betöltött szerepüket.

Végül - hozzáadott tudományos értéként - innovatív kutatási tervet alkalmaztunk az eset-kontroll vizsgálatok hálózati elemzésének elvégzésével, így új perspektívát nyújtva az NMA módszerhez. Elemzésünk arra utal, hogy a metaanalízis során minden, genetikailag összefüggő betegségekkel foglalkozó tanulmány, legyen az kohorsz- vagy eset-kontroll tanulmány, felhasználható egy hálózat felépítésére, amely értékes információkkal szolgálhat a betegségek korai felismeréséhez, diagnosztizálásához, stádiumbeosztásához, kezeléséhez és prognózisához.

## **4 Új eredmények**

- 1) A LINC-PINT és a lincRNS-P21 kifejeződésének felfelé szabályozása a H2 gáz koncentrációjával.
- 2) A LINC-PINT kifejeződése viszonylag hosszú H2-felhasználási idő alatt csökkent.
- 3) A lincRNS-P21 expressziója csökkent a H2 koncentrációval.
- 4) Az rs2228570 (FokI) és az rs13181(ERCC2) minor alléljai összefüggésbe hozhatók a bőrrákkal.
- 5) Az rs475007 (MMP1) vad típusú és heterozigóta genotípusa és az rs238406 (ERCC2) mutáns homozigóta genotípusa állt a legnagyobb valószínűséggel kapcsolatban a bőrrákkal.

## **5 Következtetések**

A LINC-PINT és a lincRNS-P21 kifejeződése a H2 gázzal történő kezelés után felfelé szabályozódott. Az SNP rs2228570 (FokI), rs13181(ERCC2), rs475007 (MMP1) és rs238406 (ERCC2) pedig a bőrrák korai biomarkereként alkalmazható.

## **6 Köszönetnyilvánítás**

Szavakkal nem tudom kifejezni hálámat témavezetőmnek, Kiss István professzor úrnak felbecsülhetetlen értékű tanácsaiért és határtalan türelméért. Kutatásom útja nem volt könnyű. Különböző váratlan okok miatt kellett átállnom az üvegharcsa melanoma modell építézésről a tüdőrákos sejtvonalra. Prof. Kiss István azonban minden alkalommal minden tőle telhetőt megtett, hogy támogasson! Sok munkája közepette minden héten segített a kutatásomban, a cikkeimben, a folyóirat beadványaimban és a karriertervemben, néha még a privát pihenő idejét is felhasználva. A kutatásaimhoz

sokszor pályázott különböző iskoláknál támogatás érdekében és különböző egyetemektől kért segítséget sejtvonalakkal és berendezésekkel kapcsolatban. Rengeteg mindenben segített nekem, amit nem tudok viszonzni.

Emellett rendkívül hálás vagyok társ-témavezetőmnek, Hongbo Liu professzornak a Kínai Orvosi Egyetemről. Az ő segítségével én sem tudnám befejezni a PhD-képzésemet. Köszönöm neki a kutatásom módszertani, elemzési és szoftveres támogatását. Semmi fizetést nem kapott, de minden tudását és készségét fenntartás nélkül megosztotta velem. Köszönöm neki, hogy az elmúlt négy évben meghallgatott, támogatott, inspirált és hatással volt rám az életemben, tanulmányaimban, karrieremben és álmaimban.

Hálás vagyok továbbá kollégáimnak, Szabó Istvánnak, Brunnerné Bayer Zsuzsannának, Szenczi Ágnesnek, Varjas Timeának és Pozsgai Évának a felszereléssel, sejtvonallal, PCR-rel és eredményekkel kapcsolatos szíves segítségükért. Türelmetlenség nélkül segítettek újra és újra. Az ő segítségük nélkül én sem vállalkozhattam volna erre az útra.

Nem tudom kifejezni a szüleim, családom és barátaim iránti hálámat és megbecsülésemet. Mindezek egyike sem valósulhatott volna meg az ő anyagi és érzelmi támogatásuk nélkül. A belém vetett hitük tartotta bennem a lelket és a motivációt.

Végül köszönetet kell mondanom a bizottság elnökeinek a felbecsülhetetlen türelmükért és visszajelzéseikért. Köszönöm nagylelkű tudásukat és szakértelmüket.

## **7 Publikációs lista**

### 7.1 Cikk a dolgozat alapján

- The relationship between single nucleotide polymorphisms and skin cancer susceptibility: A Systematic Review and Network Meta-Analysis (IF=6.24)

Lu Zhang, Eva Pozsgai, Yongan Song, John Macharia, Huda Alfatafta, Jia Zheng, Zhaoyi Li, Hongbo Liu, István Kiss

Front Oncol (2023) 13:1094309. doi: 10.3389/fonc.2023.1094309

- The therapeutic effect of hydrogen gas on lung cancer - LINC-PINT and lincRNA-P21 as biomarkers

Lu Zhang, Tímea Varjas, Eva Pozsgai, István Szabó, Ágnes Szenczi, Huda Alfatafta, Yongan Song, John Macharia, Hongbo Liu, István Kiss (IF=1.4)

Genetic Testing and Molecular Biomarkers. Submitting for publication

## 7.2 Egyéb publikációk

- Lower handgrip strength levels probably precede triglyceride glucose index and associated with diabetes in men not in women

Jia Zheng, Lu Zhang, Min Jiang

Journal of Diabetes Investigation, vol. 13, no. 1, pp. 148–155, 2022, doi: 10.1111/jdi.13626.

- Are chemical compounds in medical mushrooms potent against colorectal cancer carcinogenesis and antimicrobial growth?

John M. Macharia, Lu Zhang, Ruth W. Mwangi, Nora Rozmann, Zsolt Kaposztas, Tímea Varjas, Miklós Sugár, Huda Alfatafta, Márton Pintér, Raposa L. Bence

Cancer Cell Int, vol. 22, no. 1, p. 379, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12935-022-02798-2.

- Microarray data analysis to identify miRNA biomarkers and construct the lincRNA-miRNA-mRNA network in lung adenocarcinoma

Yongan Song, Leonardo Kelava, Lu Zhang, István Kiss

Medicine, vol. 101, no. 36, p. e30393, Sep. 2022, doi: 10.1097/MD.00000000000030393.

- Effect of the knee replacement surgery on activity level based on ActivPAL: a systematic review and meta-analysis study

Alfatafta Huda, Alfatafta Mahmoud, Onchonga David, Hammoud Sahar, Khatatbeh Haitham, Zhang Lu, Boncz Imre, Lohner Szimonetta, Molics Bálint

Musculoskeletal Disorders, vol. 23, no. 1, p. 576, Jun. 2022, doi: 10.1186/s12891-022-05531-2.

- Effect of using knee valgus brace on pain and activity level over different time intervals among patients with medial knee OA: systematic review

Huda Alfatafta, David Onchonga, Mahmoud Alfatafta, Lu Zhang, Imre Boncz, Szimonetta Lohner, Bálint Molics

BMC Musculoskeletal Disorders, vol. 23, no. 1, p. 576, Jun. 2022, doi: 10.1186/s12891-022-05531-2.

- Focusing on the premature death of redeployed miners in China: an analysis of cause-of-death information from non-communicable diseases

Wei Xian, Bing Han, Leizhen Xia, Yining Ma, Haodi Xu, Lu Zhang, Li Li, Hongbo Liu

Global Health, vol. 15, p. 7, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12992-019-0450-5.

- Effect of socio-demographic characteristics on social security in northeast China

Wei Xian, Cheng Jin, Bing Han, Xueying Xu, Lu Zhang, Hongbo Liu

Health Soc Care Community, Aug. 2020, doi: 10.1111/hsc.13127.