

## Válasz Dr. Balázs Margit, az MTA doktora, egyetemi tanár opponensi bírálatára

Köszönöm értekezésem alapos és részletes bírálatát és nagyon örülök, hogy a tézisekben szereplő eredményeket megfelelőnek tartja az MTA doktora cím megszerzéséhez.

A disszertációval kapcsolatos kérdésekre és megjegyzésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

*Professzor Asszony megjegyzi, hogy szerencsés lett volna az eredeti közlemények csatolása pdf-ben, illetve hiányolja azon közleményekre vonatkozó scientometriai adatok feltüntetését, amelyekre a disszertáció alapult.*

A formai követelményeket illetően mindenütt igyekeztem szigorúan követni az MTA útmutatójában szereplő előírásokat és mindent aszerint próbáltam elkészíteni. A tudományometriai adatokat illetően számos részletes táblázatot kellett ki-, illetve feltölteni, ezért nem gondoltam rá, hogy a disszertációba is elhelyezzem ezeket az adatokat. Hasonlóképpen, mivel a disszertációt nem rövid értekezés formájában nyújtottam be, hanem teljes értekezést, ezért komolyan vettem a követelményeknek azt a részét, miszerint „...a kérelemhez olyan doktori művet kell mellékelni, amely önmagában véve is alkalmas a kérelmező eredeti tudományos teljesítményének értékelésére...”, és így nem is mertem volna az eredeti közleményeket csatolni.

*Professzor Asszony túlzottan részletesnek találta a bevezetést.* Törekedtem rá, hogy bemutassam a témaválasztásom indokait, illetve megfelelő kontextusba helyezzem az elvégzett vizsgálatokat. Sajnálom, ha ebbéli igyekezetemben kissé túlzásba estem a terjedelmet illetően.

*E helyen Professzor Asszony észrevételezi a legújabb irodalmi összefoglalások hiányát, és azt kérdezi, hogy a cervixrák-kockázat és a p53 gén kapcsolatát hogyan látom ezek függvényében.*

A p53 és a cervixrák kérdését azért nem tartottam relevánsnak és nem tárgyaltam részletesebben a bevezetésben, mert a p53 gén polimorfizmusát nem a cervixrák kapcsán vizsgáltam, és ezzel kapcsolatban mindössze csak egyetlen dologra akartam utalni, a p53 és a cervixrák kapcsolatának sajátos voltára.

Az a tény, hogy az elmúlt három évben is több, mint két tucat közlemény jelent meg p53 polimorfizmusok és a cervixrák kapcsolatát illetően, mutatja, hogy a kérdés még mindig nincs lezárva. Jelenleg úgy tűnik, hogy – bár a HPV E6 fehérje általi degradáció üteme különbözik a két génvariáns által kódolt p53 fehérjéknél – ez nem elég ahhoz, hogy az Arg72Pro polimorfizmus minden népességben egyértelmű kockázatmódosító hatású legyen. Vannak viszont olyan tényezők, amelyek befolyásolhatják a p53-cervixrák kölcsönhatást, és így egyes csoportokban ez a polimorfizmus mégis releváns lehet. A p53 allélmegoszlások is jelentős különbséget mutatnak egyes populációk között (ázsiaiakban a Pro allél gyakorisága magasabb, továbbá a Pro allél előfordulása északtól dél felé növekvő gyakoriságot mutat), ami úgyszintén különbségeket eredményezhet. Zhou ázsiai populációkon végzett vizsgálatok meta-analízisében úgy találta, hogy a – korábbi közleményekkel ellentétben Pro/Pro homozigóták kockázata magasabb a heterozigótákéhoz képest (Zhou, 2012). Országokként lebontva csak az indiai tanulmányok csoportja mutatott szignifikáns összefüggést. Más aspektusból vizsgálta a kérdést Habbous, aki úgy találta, hogy a p53 polimorfizmus a laphám-eredetű intraepiteliális léziók (SIL) karcinomává való

progresszióját befolyásolja (méhnyakrák vs. SIL) és a daganatiniciációt (SIL vs. normál) vagy a daganatkialakulás kockázatát (méhnyakrák vs. normál) pedig nem (Habbous, 2012). Az Arg allél eme kockázatemelő hatása csak HPV pozitív esetekben volt igazolható, HPV-negatív betegeknel nem találtak összefüggést a p53-polimorfizmussal. A fentiekkel nehezen egyeztethető össze az a tanulmány, amely szerint az Arg allél a cervikális intraepiteliális neoplázia kockázatát fokozza, de a cervixrákét nem (González-Herrera, 2014). Tovább bonyolítja a lehetőségeket, hogy egyes szerzők gén-gén kölcsönhatásokat is találtak (MTHFR-p53: González-Herrera, 2014; MDM2-p53: Singhal, 2013). Elképzelhető az is, hogy a különböző HPV variánsok is befolyásolják a p53-cervixrák kölcsönhatást, amint ezt Burrioni a HPV 16 esetében (T350G) vizsgálta is (Burrioni, 2013).

*Célkitűzések:* Valóban szerencsésebb lett volna az „általános populáció” és a „magas rizikójú” kifejezések használata.

*„Az I. pontban leírt génexpressziós változások vizsgálatához miért a c-myc és Ha-RAS onkogéneket választotta?”*

Számos olyan gén ismeretes, amelynek expressziója megváltozik a malignus transzformáció során. Intézetünk legfőbb kutatási területe az elmúlt 20 évben a génexpresszió-változások korai karcinogén hatás markereként való alkalmazhatósága volt. Ember István Professzor Úr számos publikációban igazolta, hogy ezek a gének a karcinogén expozíciók korai hatását expresszió-változásaikon keresztül érzékenyen jelzik. Ha irodalmi áttekintést végzünk, akkor a c-myc esetében bőségesen találunk expresszióváltozásokkal foglalkozó közleményeket, míg a Ha-ras gén expresszióváltozásainak vizsgálatával kevesebben foglalkoztak, de itt is vannak adatok a karcinogén kezelés hatására történő változásokról (Ehm, 1988; Sadhu, 1993; Messina, 2012). Ezek a biomarkerek nemcsak állatkísérletekben, hanem humán vizsgálatokban is használhatónak bizonyultak, így tehát nem tartottam szükségesnek ezen a rendszeren változtatni, hanem inkább a korábbi vizsgálatok további megerősítésére, kiterjesztésére törekedtem.

*„Milyen más adatok vannak a p53 gén expresszió emelkedésére kémiai karcinogén expozíciót követően?”*

Az újabb közleményeket kiemelve Di és mtsai például tengeri kagylókban vizsgálták a p53 és a ras gének expresszióváltozásait benzo[a]pirén-kezelés hatására (Di, 2012), és találtak p53-expresszióemelkedést. Luo és mtsai többek között a p53 expresszióváltozásait vizsgálták kétlépcsős (dietilnitrózamin/szén-tetraklorid) májtumor-modellben (Luo, 2013). Eredményeik szerint a bekövetkező expresszió-emelkedés a kezelés hatására kialakuló májsejt-proliferáció következménye. Tung és mtsai viszont egér sejtvonalakban a benzo[a]pirén kezelés p53-expressziót (Tung, 2014) csökkentő hatását írták le. Az utóbbi időben a karcinogén-indukálta p53 expresszióváltozások egyik lehetséges mechanizmusaként azonosították olyan mikroRNS-ek expresszióváltozásait (mint pl. a miR-125b), amelyeknek a p53 gén a targetjeik között szerepel (Gordon, 2014). Érdekes egyébként, hogy ugyanakkor a p53 gén pedig az érési folyamat egyes fehérjéivel való kölcsönhatásain keresztül befolyásolja a mikroRNS-ek expresszióját (Izzotti, 2014). Mások epigenetikus mechanizmusokat tártak fel a karcinogének hatására bekövetkező p53 expresszióváltozások hátterében (Yasei, 2013).

### **Eredmények.**

Mindenekelőtt nagyon köszönöm, hogy Opponens Asszony pontokba szedve részletesen kiemeli az elért új eredményeket.

*„Az 1-nitropirén kezelést követően mi volt a kontroll a csontvelő mintánál, nincs rá utalás a szövegben és hiányzik az ábráról is ennek magyarázata.”*

A csontvelő-mintánál ugyanúgy, mint az összes többi szervnél, a csak oldószerrel kezelt kontroll állatokhoz viszonyítottuk az expresszió-változásokat, ezt az anyag- és módszer fejezetben írtam le, és sajnos az eredményeknél már nem tüntettem ismét fel. A kontroll állatok csontvelőjében az adott időpontban a vizsgált gén expressziója gyakorlatilag nem volt mérhető. Ez a jelenség a másik génexpressziós állatkísérletnél, is megfigyelhető volt (23. ábra).

*Professzor Asszony – Tímár Professzor Úrhoz hasonlóan – nehezményezi a génexpressziós ábrák rossz áttekinthetőségét, elsősorban a szerencsétlen színválasztás miatt. Úgy gondoltam, hogy különböző színek választása túlságosan tarkává és ezért áttekinthetetlenné teszi az ábrát, ezért próbálkoztam egyazon szín különböző árnyalataival, de sajnos ez sem bizonyult optimális megoldásnak.*

*„Az eredményeket bemutató ábrákról lemaradt a szignifikáns értékek jelölése.”*

24-25. ábránál sajnos valóban lemaradt a statisztikai szignifikancia jelzése az ábráról. Az ábrákat magyarázó szövegben szerencsére mindenütt jeleztem az elváltozások szignifikáns vagy nem szignifikáns voltát.

*„A 24-es és a 25-ös ábra kontroll csoportjában mért expressziós értékek jelentősen eltérnek. Mivel magyarázható ez? Mennyiben hasonlít ez a kontroll csoport a két évvel korábbi kontroll csoporthoz?”*

A 24-es és a 25-ös ábra kontroll csoportjai annyiban különböztek, hogy két évvel a kezelés után csak 17 betegről tudtunk vért venni, és ezért tehát a 25. ábra kontroll csoportja a másik ábrán szereplő kontroll alcsoportjának tekinthető. A két kontroll csoport közötti expressziók eltéréseinek másik része a szemikvantitatív jellegű slot-blot vizsgálati módszerből is adódhat, amikor is az egyazon hibridizációs sorozatból származó minták vethetők össze egészen pontosan (pl. bármelyik ábrán a kezelés előtti és a kezelés utáni csoportok), és az egyes sorozatok között kisebb eltérések lehetnek.

*„Mennyiben lehetünk biztosak abban, hogy a 2 évvel később mért génexpresszió-változások valóban a kezelések miatt állnak fenn? ...”*

Ebben a tekintetben igyekeztem óvatosan fogalmazni a disszertációban is, és úgy gondolom, hogy a génexpresszió-változások pontos okaival, mechanizmusával nem vagyunk tisztában, és elképzelhető akár a kezelésektől független mechanizmus is (a kezelés vagy a daganat hatására a szervezetben létrejövő változások hatása, vagy esetleg akár recidíva korai jele). Korábbi állatkísérleteink arra utaltak, hogy karcinogén kezelés után (beleértve egyes citosztatikumokat, illetve citosztatikus protokollokat) hosszabb idő elteltével még mindig gén-overexpressziókat lehetett mérni a kísérleti állatok különböző szerveiben (Ember, 1998a; Ember, 1998b; Gyöngyi, 2001). Véleményem szerint a közleményt „pilot study”-ként tekinthetjük, ami felhívta a figyelmet egy érdekes jelenségre. Ha ezek az eredmények nagyobb elemszámú mintán verifikálhatók, akkor egyrészt érdemes elgondolkodni a gyakorlati alkalmazás (a kezelt betegek monitorozásának új módszere) lehetőségén, másrészt vizsgálni kell a génexpresszió-változások hátterében álló mechanizmusokat.

*„A dolgozatban leírt 3 gén expressziójának eltéréseit mennyiben egészítik ki a microarray alapú génexpressziós vizsgálatok eredményei? A jelölt véleménye szerint a jelenlegi globális génexpressziós vizsgálatok alapján melyek lehetnek érzékeny biomarkerek az általa is vizsgált fej-nyaki daganatos betegeknél?”*

A microarray alapú génexpressziós vizsgálatokról az a véleményem, hogy teljesen új dimenziót jelentenek a korábbi metodikákhoz képest. A keringő RNS-ek, mint biomarkerek alkalmazásának (tumoros vagy arra gyanús betegek véréből) kutatásában például kiváló stratégia a microarray alapú, nagyszámú RNS-re kiterjedő vizsgálat, amikor is a relevánsnak talált RNS-ek szerepét real-time PCR-ral verifikálják. Míg korábban keringő mRNS-eket próbáltak a tumoros állapot biomarkereként (például egy esetleges szűrővizsgálattá fejlesztés lehetősége miatt) vizsgálni (Li, 2006), újabban a mikroRNS-ekkel kapcsolatos ilyen irányú vizsgálatok tűnnek ígéretesnek (Zeng, 2012; Summerer, 2013). A vérből mért expresszióváltozások terén ez lehet saját vizsgálatainknak az Opponens Asszony által kérdezett kiegészítése, vagy továbbfejlesztése. A szöveti szintű expresszió terén hasonló a helyzet, a microarray alapú vizsgálatokkal megfelelő bioinformatikai módszerekkel próbálnak olyan expressziós mintázatokat azonosítani, amelyek a karcinogén expozíciót jelzik, jellemzik. Benzo[a]pirén-kezelés hatására történő *in vivo* génexpresszió-változásokat vizsgáltak például Labib és mtsai (Labib, 2013), és próbáltak olyan mintázatokat azonosítani, amelyek a korai hatás betegségkialakulás szempontjából releváns markerei. Saját vizsgálatunkhoz hasonlóan természetesen a microarray-alapú génexpresszió-vizsgálatokra is jellemző, hogy nemcsak a genotoxikus, hanem a nem genotoxikus karcinogének hatásait is képes kimutatni (Hrubá, 2011). További fejlesztési, kiegészítési lehetőség – bár ez a prevenciótól inkább a klinikum irányába tett lépés – a tumorok expressziós mintázatának microarray-alapú vizsgálata, amikor is klinikopathológiai sajátosságokkal kapcsolatba hozható, illetőleg prognosztikus jelentőséggel bíró patternek azonosíthatók (Ni, 2012).

*„...a jelenlegi, globális génexpressziós vizsgálatok alapján melyek lehetnek érzékeny biomarkerek a vizsgált fej-nyaki daganatos betegeknél?”*

Az elmúlt időszak hihetetlen fejlődése és a publikációk nagy száma miatt a kérdést nem könnyű megválaszolni. Mindazonáltal úgy gondolom, hogy pontosan a globális génexpressziós vizsgálatok előnyeit kihasználva nem egyes gének expressziói, hanem komplex expressziós mintázatok lesznek azok, amelyek ilyen biomarkerekként majd felhasználhatók (Dadkhan, 2013). Ugyancsak ígéretesnek tartom a mikroRNS-expressziókkal kapcsolatos eredményeket, prognosztikus vagy kockázati szempontból releváns mikroRNS-ek azonosítását, és biomarkerekként történő bevezetését e területen (Wang, 2013; Lu, 2014). Végül nagyon biztató adatokat láthatunk az utóbbi időben epigenom-metilációs vizsgálatokban azonosított biomarkerekről is (Zhang, 2013; Arantes, 2014).

*Professzor Asszony felhívja a figyelmemet Liu és mtsai 2010-es közleményére, amely szerint a miR-146a polimorfizmusai inkább a progresszióhoz, mint a kockázathoz köthetők a szájüregi daganatokban.*

A disszertációban ezt a közleményt (Liu, 2010) viszonylag részletesen elemeztem is a 128. oldalon, összevetve saját vizsgálatunkkal. Ebben az összehasonlításban a mi vizsgálatunk fő előnye a pontosabb megközelítés, vagyis, hogy több tényező szerint is illesztett kontroll csoportot használtunk. A két vizsgálat annyiban különbözött még egymástól, hogy a dohányosok aránya Liu vizsgálatában alacsonyabb volt (ez lényegében magyarázható a hazai és az amerikai prevalenciák közötti különbséggel), illetve hogy a két populáció valamelyest különbözött az egyes genotípusok megoszlását illetően (a genotipizálás egyébként hasonló módszerekkel történt). Említésre méltó

továbbá, hogy bár Liu és mtsai vizsgálatában a pre-miR-146a rs2910164 polimorfizmus önmagában nem emelte a szájüregi daganatok kockázatát, más mikroRNS polimorfizmusokkal együtt viszont már kockázatemelő hatású volt. Sajnálatos, hogy – bár a szövegben hivatkoztam rá és foglalkoztam vele – a közlemény az irodalmak felsorolásából kimaradt. Ezt nem menti az a tény sem, hogy 9 Liu nevű szerzőtől idéztem, és nyilván így fordulhatott elő, hogy közülük egyet tévedésből kihagytam a felsorolásból.

*„Mennyiben összevethetők eredményei azokkal az adatokkal, amelyek 2012-ben jelentek meg 'Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer', figyelembe véve, hogy a környezeti tényezők nagy mértékben azonosak a szájüregi és fej-nyaki daganatok esetén?”*

Ezt a közleményt (Chu, 2012) azért tartom kevésbé összevethetőnek saját munkánkkal, mert ázsiai populáció lévén a genotípusok megoszlása teljesen más, mint a kaukázusi népegekben tapasztalt megoszlások (az idézett vizsgálat kontroll csoportjában a CC homozigóták aránya 41% volt), illetve a genetikai háttér természetesen nemcsak e polimorfizmus tekintetében különbözik egymástól. Számos polimorfizmusnál ismeretes egyébként, hogy egyes összefüggések csak ázsiai, mások csak kaukázusi populációkban mutathatók ki. További lényeges különbség még a bételrágás, mint jelentős karcinogén tényező magas prevalenciája az idézett vizsgálat résztvevői között, ami ugyancsak nehezen összevethetővé teszi a két közleményt.

*Miért nem lehetett ugyanannak a betegcsoportnak a mintáin vizsgálni ezeknek a polimorfizmusoknak a hatását, mint a CYP1A1 és UGT1A1 génekét?*

A prognózisra vonatkozó két vizsgálat 4 évvel egymás után történt, és az első, (a szombathelyi beteganyagot feldolgozó) vizsgálat mintáiból nem képeztünk biobankot. A második vizsgálat a Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikával kialakult későbbi együttműködés keretében jött létre, ami így technikailag a fizikai közelség miatt is egyszerűbb volt.

*„Módosítják-e megfigyeléseiket a 2013-ban megjelent meta-analízis alapján elért eredmények...?”*

Az idézett meta-analízis (Chen, 2014) 7 tanulmányon alapul, amelyek közül 3 dolgozott 100 fölötti gégerákos beteggel (közülük 2 statisztikailag szignifikáns összefüggést talált az XRCC1 Arg399Gln polimorfizmus és a gégerák kockázata között), míg a többi igen kis betegcsoportokat használt (betegek száma: 40-88). A heterogenitásvizsgálat szerint az elemzésbe vont tanulmányok heterogének voltak, és ezért a szerzők is a random hatás modellt alkalmazták. Eszerint a modell szerint (ellentétben a fix hatás modellel) nem egy közös, uniform hatás létezik, hanem az adott populációkban a hatás ténylegesen különbözhet egymástól, a kombinált hatás ezeknek a súlyozott átlaga. Ahogy korábban is utaltam rá, ilyen különbségeket genetikai polimorfizmusok daganatos kockázatot befolyásoló hatásának vizsgálata kapcsán számos alkalommal találhatunk egyes populációk között: a legtriviálisabb és leggyakrabban említett példa az ázsiai és kaukázusi populációk között nem ritkán talált eltérés. Az általunk végzett vizsgálat a hazai népegekre vonatkozott, így az idézett tanulmány nem mond ellent eredményeinknek.

*„Véleményem szerint a fejezetben bemutatott több mint 10 túlélési görbe felesleges, ha nincs szignifikáns különbség, a szöveges összefoglalást jobban lehetett volna követni.”*

Valóban felesleges lehet a túl sok görbe, a dolgozat összeállításakor magam is gondolkodtam az ábrázolás tömörebb lehetőségein. Mivel azonban azokat a görbéket, ahol statisztikailag szignifikáns eltérések voltak, mindenképpen be akartam mutatni, végül úgy gondoltam, hogy inkább az összes görbét beillesztem, mert nem akartam olyan látszatot kelteni, hogy csak a „jó eredményeket” hangsúlyozom, a többi fölött elsiklok.

*A 104. oldalon írottak* véleményem szerint összhangban vannak azzal a kijelentéssel, miszerint a daganatos halálozási különbségekért nem elsősorban genetikai tényezők a felelősek. A roma népességben – az indiai megoszlásokhoz hasonlóan – egyes allélek gyakorisága eltér a hazai nem roma népességtől, de míg némelyek növelik, addig mások csökkentik körükben a daganatos kockázatot.

*Opponens Asszony az irodalmi hivatkozásokat hiányolja* a megbeszélés azon részéből, ahol a 134. oldalon említettem, hogy olyan allélpolimorfizmusokat választottunk a roma vizsgálatokhoz, amelyek irodalmi adatok szerint befolyásolják egyes daganatok kockázatát. Mivel az egyes polimorfizmusok daganatos kockázatot emelő hatásával kapcsolatban a bevezetésben számos ilyen irodalomra hivatkoztam (Kawajiri, 1990; Kawajiri, 1993b; Zhan, 2011; Gronau, 2003; Reszka, 2008; Gao, 2011; Zhu, 2012; Zhang, 2011; Mo, 2009; Jiang, 2011; Langevin, 2010; Sergentanis, 2010; Economopoulos, 2010; Gao, 2011; Garcia-Closas, 2005; Sanderson, 2007; Moore, 2011; Storey, 1998; Rosenthal, 1998; Agorastos, 2000; Yee, 2004; Liu, 2011), és ezeket a megbeszélés első felében még továbbiakkal egészítettem ki (Liu, 2013; Klimčáková, 2011; Shin, 2008; Liu, 2012a; Liu, 2012b; Economopoulos, 2010; Wang, 2011; Zhang, 2012; Liao, 2010; Gao, 2010; Raimondi, 2009), úgy gondoltam, hogy inkább zavaró lenne ezeket itt megismételni. Az indiai allélmegoszlásokra vonatkozó irodalmakat az alábbiakban pótolom: Zhao, 1995; Tandle, 2001; Buch, 2002.

*„...milyen újabb eredmények állnak rendelkezésre a roma népesség betegségek iránti fogékonyságát jellemző polimorfizmusok elemzésére vonatkozóan (hazai és nemzetközi adatok)?”*

Az értekezés megbeszélés fejezetében megemlítettem ilyen polimorfizmusokat (pl. CYP2C19, MTHFR, PAI-1, ACE, ApoE), és közleményeket (elsősorban László, Sipeky, Fehér, Macekova, Zeljko, Gorgone és Sivakova munkái), bár – mivel többségükben a daganatos kockázat szempontjából nem relevánsak – részletesen nem foglalkoztam velük. E területről az utóbbi két évben született eredmények közül többek között meg lehet még említeni a toll-like receptor 2 polimorfizmusát, amely fertőző betegségek iránti fogékonysággal lehet kapcsolatban és romák között a 2258A allél jóval ritkább, mint más európai populációkban (Ioana, 2012). A PTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet munkacsoportja vizsgálta az interleukin-23 receptor génjének 8 polimorfizmusát (amelyek különböző autoimmun betegségek kockázatát befolyásolhatják) és romák között gyakoribbnak találták a magasabb kockázatú alléleket, mint a hazai nem roma népességben (Magyari, 2013). Huszonkét különböző citokin-gén allélmegoszlásait írta le Trajkov macedóniai roma népességben (Trajkov, 2012), de nem végeztek részletes elemzést nem roma populációkkal való összehasonlításban vagy egyes betegségekre való fogékonyság tekintetében (annak ellenére, hogy ezek közül a polimorfizmusok közül többet kapcsolatba hoztak már pl. az asztma vagy a COPD kockázatával). Kissé lazábban kapcsolódik disszertációmhoz az V. faktor Leiden mutáció gyakoriságát vizsgáló szlovákiai közlemény, miszerint e mutáció gyakoribb romák között (Bôžiková, 2012), illetve az rs4946728 és rs1040411 SNP-k vizsgálata (ezek a polimorfizmusok a Hodgkin-kór kezelése után kialakuló másodlagos daganatok kockázatával vannak kapcsolatban), ami nem talált lényeges különbséget a hazai roma/nem roma népesség között (Várszegi, 2013). A DE OEC Népegészségügyi Kar Megelőző Orvostani Intézetében telepszerű körülmények között élők (döntően romák) allélpolimorfizmusait vizsgálták az általános magyar népességgel összehasonlítva (Diószegi, 2013). A vizsgált 24 SNP közül, amelyek az alkoholdependencia

kialakulásával hozhatók kapcsolatba, 17 allélmegoszlás esetében találtak roma/nem roma eltéréseket. Ez a mi vizsgálatunknál nagyobb elemszámon elvégzett és több polimorfizmusra kiterjedő elemzés azért különösen érdekes, mert 10 év távlatából nézve mutat jelentős hasonlóságot saját eredményeinkkel: a magas kockázatú allélek egyes polimorfizmusoknál a romák között, másikaknál pedig a nem romák között voltak gyakoribbak.

**Megbeszélés.** *„A fejezetben az eredmények összefoglalása az irodalmi adatok tükrében történik, jól követhető, olvasmányos formában”*

Köszönöm Opponens Asszony pozitív értékelését a fejezetről.

*„Melyek azok a mechanizmusok, amelyek tisztázása sürgető az állatkísérletek alapján kapott eredmények verifikálásához?”*

Véleményem szerint a legfontosabb, hogy a korai biomarkerek szerepét verifikálni kell a tényleges daganatkialakulásban, vagyis be kell bizonyítani, hogy a korai biomarkerek „pozitív” jelzései valóban a későbbi daganatkialakulás kockázatára vonatkoznak. Intézetünkben már voltak hosszú távú vizsgálatok is génexpresszió-változásokra vonatkozóan (Ember, 1998a; Ember, 1998b; Gyöngyi, 2001), de a definitív verifikáció szerencsés lenne. Ugyancsak fontos lenne tisztázni azokat a pontos mechanizmusokat, amelyeken keresztül a génexpressziót befolyásoló hatások érvényesülnek. Bár erre vonatkozóan vannak részinformációk, amelyeket említettem is a diszkusszióban, a teljes és pontos kép még nem állt össze. Ehhez kapcsolódóan tisztázni kellene – elsősorban a p53, másodsorban a Ha-ras gének esetében –, hogy a kétségtelenül jelen lévő nem genotoxicitáson keresztül érvényesülő hatások mellett szóba jöhetnek-e mutációk a génexpresszió-változások hátterében és ha igen, milyen mértékben.

*„Milyen adatok vannak arra vonatkozóan, hogy a daganatos halálozásért egyéni érzékenység jellegű genetikai tényezők tehetők felelőssé?”*

Az irodalomban található becslések és elemzések közül a kolorektális daganatok példáján keresztül szeretném megválaszolni ezt a kérdést. Lichtenstein és munkatársai 44788 ikerpár adatainak feldolgozásával becsülték meg a daganatok genetikai komponenseit. Különböző daganatok esetén meglehetősen eltérő értékeket kaptak, a gyakorlatilag minimális genetikai komponenst mutató daganatoktól a viszonylag magas arányokig – prosztatatarák 42%, vastagbélrák 35%, emlőrák 27%. A fej-nyaki daganatok közül egyébként a gégeráknál találtak jelentős konkordanciát az ikerpárok tagjai között (Lichtenstein P, 2000). Más elemzések az örökletes vastagbél-daganatokat, és daganatos szindrómák részarányát az összes vastagbél-daganat 2-6%-ára teszik (Jasperson, 2010; Aaltonen, 2007). Eszerint az alacsony penetranciájú tényezők részaránya a két fenti érték különbsége, azaz a vastagbél-daganatok esetén mintegy 30% (Burt, 2007; Picelli, 2013). Természetesen különböző becslések ismeretesek (pl. Jiao és mtsai szerint a gyakoribb SNP-ek legalább 7,4%-ban adják az örökletes hátteret, míg a GWAS által azonosított SNP-ek mintegy 0,65%-ot magyaráznak) de az kétségtelen, hogy az egyéni érzékenység jellegű genetikai hatásokat a GWAS segítségével és a kandidáns gén megközelítéssel azonosított SNP-ek egyelőre együttesen is csak kisebb részben magyarázzák (Jiao, 2014).

*„Az utóbbi időben bevezetésre került genom szintű asszociációs vizsgálatok, melyek nemcsak egyedi gének vagy néhány gēnpolimorfizmus szerepét vizsgálják, milyen eredményeket szolgáltattak a tézisekben szereplő betegségekre vonatkozóan?”*

Az általam ismert utolsó nagy összefoglaló közlemény (Zhang, 2014) szerint a vastagbélrák vonatkozásában a teljesgenom asszociációs vizsgálatok 48 SNP-et azonosítottak eddig, amelyek közül az összefüggés erőssége 3-nál volt  $OR > 1,3$ , és további 5-nél  $> 1,2$ . Ezen gének egy része ismert biológiai utakkal (pl. MAP kináz jelátviteli út), más részük a sejtciklus vagy a gēnexpressziók szabályozásával, további csoportjuk a genom-instabilitással kapcsolatos, és vannak közöttük nem besorolható, illetve ismeretlen funkciójú polimorfizmusok is. Fej-nyaki daganatokra is történt már teljesgenom asszociációs vizsgálat, többek között a 4q21, 4q23 és a 12q24 régiókban azonosítottak kockázatot befolyásoló genetikai tényezőket (McKay, 2011, Bhatnagar, 2012). Az e vizsgálatokban azonosított tényezők egyike sem egyezett meg az általam vizsgált genetikai tényezőkkel. Ez is jól demonstrálja azt, hogy a két megközelítés (kandidáns gēn/teljesgenom asszociáció) egyelőre még egymást jól kiegészíti. Chang és mtsai nagy szisztémás áttekintésükben úgy találták, hogy a daganatok iránti érzékenységet befolyásoló tényezőknek mindössze 7,1%-a mutatott asszociációt GWAS és kandidáns gēn megközelítésű vizsgálatokban egyaránt, vagyis a két módszerrel azonosított tényezők közötti átfedés egyelőre viszonylag alacsony (Chang, 2014).

*„Az allélpolimorfizmusok vizsgálatánál mennyire tekinthető reprezentatívnak a hazai roma és nem roma népesség mintapopulációja?”*

Mivel az etnikai hovatartozásról pontos adatok nincsenek, ezért úgy gondolom, jelenleg Magyarországon elvileg sem lehetne biztosan reprezentatív mintapopulációt definiálni. Több más tényező is a reprezentativitás ellen hatott: gyermekek nem szerepeltek a minták között, a roma minták nem az ország teljes területéről származtak, távoli, nem tudott rokonság lehetősége az egyes résztvevők között. Vizsgálatunk tehát szigorú reprezentativitási kritériumoknak nem tudhat megfelelni, de ha megfelelne, akkor viszont az indiai összehasonlítás ereje csökkent volna, ahol az allélmegoszlások az adott allélpolimorfizmus és valamilyen betegség kockázata közötti kapcsolat vizsgálatának a kontrollcsoportjából származnak (tehát nem a teljes populációra reprezentatív mintából). Fontos indirekt érv a használhatóság (a reprezentativitás elfogadható mértéke) mellett, hogy a roma népesség allélmegoszlásai döntő többségben nagyon hasonlítottak az indiai allélmegoszlásokhoz, illetve a nem roma allélgyakoriságok pedig más vizsgálatokban talált hazai megoszlásokhoz (vagy más kaukázusi populációban közölt megoszlásokhoz, ahol nem volt hazai összehasonlítási lehetőség).

Még egyszer nagyon köszönöm az alapos, segítő szándékú bírálatot, a kritikai és az elismerő megjegyzéseket egyaránt. Megtisztelő, hogy Professor Asszony javasolja a védés kitézését és támogatja az MTA doktori cím megszerzését.

dr. Kiss István

Pécs, 2014. május 19.



- Aaltonen L, Johns L, Jarvinen H, Mecklin JP, Houlston R. Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin Cancer Res* 13: 356–361. 2007.
- Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014 Jun;50(6):587-592.
- Bhatnagar R, Dabholkar J, Saranath D. Genome-wide disease association study in chewing tobacco associated oral cancers. *Oral Oncol.* 2012;48(9):831-5.
- Bôžiková A, Gabriková D, Sovičová A, Behulová R, Mačeková S, Boroňová I, et al. The frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Slovak and Roma (Gypsy) ethnic group of Eastern Slovakia. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;34(3):406-9.
- Buch S, Kotekar A, Kawle D, Bhisey R. Polymorphisms at CYP and GST gene loci. Prevalence in the Indian population. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002;128:627-631.
- Burroni E, Bisanzi S, Sani C, Puliti D, Carozzi F. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. *J Med Virol.* 2013;85(1):83-90. Epub 2012 Nov 4.
- Burt R. Inheritance of colorectal cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 4(4): 2007, 293–300.
- Chang CQ, Yesupriya A, Rowell JL, Pimentel CB, Clyne M, Gwinn M, et al. Schully SD1A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(3):402-8.
- Chen W, Wang ZY, Xu FL, Wu KM, Zhang Y, Xu L, Wang QP. Association of XRCC1 genetic polymorphism (Arg399Gln) with laryngeal cancer: a meta-analysis based on 4,031 subjects. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1637-1640.
- Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, Chien MH, Chen MK, Yang SF. Impacts of MicroRNA Gene Polymorphisms on the Susceptibility of Environmental Factors Leading to Carcinogenesis in Oral Cancer. *PLoS One* 2012;7(6):e39777.
- Dadkhah E, Naseh H, Farshchian M, Memar B, Sankian M, Bagheri R, et al. A cancer-array approach elucidates the immune escape mechanism and defects in the DNA repair system in esophageal squamous cell carcinoma. *Arch Iran Med.* 2013;16(8):463-70.
- Di Y, Schroeder DC, Highfield A, Readman JW, Jha AN. Tissue-specific expression of p53 and ras genes in response to the environmental genotoxicant benzo(α)pyrene in marine mussels. *Environ Sci Technol.* 2011;45(20):8974-8981.
- Diószegi J, Fiatal Sz, Tóth R, Moravcsik-Kornyicki Á, Sándor J, Ádány R. Alkohol fogyasztási szokásokat befolyásoló génváltozatok vizsgálata a Magyar lakosság és telepszerű körülmények között élők körében. *Népegészségügy,* 91(3): 189.
- Ehm I, Denner J, Jandrig B, Nissen E. In vitro transformation of rat cells by 3-methylcholanthrene: activation of the ras oncogene. *Exp Pathol.* 1988;34(3):133-139.
- Ember I, Kiss I, Ghodrattollah N, Raposa T. Effect of ABVD therapeutic protocol on oncogene and tumor suppressor gene expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Res.* 1998;18(2A):1149-52.
- Ember I, Kiss I, Raposa T, Nowrasteh G, Matolcsy A. In vivo effects of CHOP protocol on onco and suppressor gene expression: follow-up study. *In Vivo.* 1998;12(5):489-94.

González-Herrera L, Rodríguez-Morales P, Gonza Lez-Losa MD, Pérez-Mendoza G, Canul-Canché J, Rosado-López I, Cetina TC. MTHFR/p53 polymorphisms as genetic factors for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer in HPV-infected Mexican women. *Int J Biol Markers*. 2014;27:0. [Epub ahead of print]

Gordon MW, Yan F, Zhong X, Mazumder PB, Xu-Monette ZY, Zou D, Young KH, Ramos KS, Li Y. Regulation of p53-targeting microRNAs by polycyclic aromatic hydrocarbons: Implications in the etiology of multiple myeloma. *Mol Carcinog*. 2014. Epub 2014. May 6.

Gyöngyi Z, Nádasi E, Varga C, Kiss I, Ember I. Long-term effects of 1-nitropyrene on oncogene and tumor suppressor gene expression. *Anticancer Res*. 2001;21(6A):3937-40.

Hrubá E, Vondráček J, Líbalová H, Topinka J, Bryja V, Souček K, Machala M. Gene expression changes in human prostate carcinoma cells exposed to genotoxic and nongenotoxic aryl hydrocarbon receptor ligands. *Toxicol Lett*. 2011;206(2):178-188.

Ioana M1, Ferwerda B, Plantinga TS, Stappers M, Oosting M, McCall M, et al. Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1917-22.

Izzotti A, Pulliero A. The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *Int J Hyg Environ Health*. 2014. Epub 2014. Jan 28.

Jiao S, Peters U, Berndt S, Brenner H, Butterbach K, Caan BJ, et al. Estimating the heritability of colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2014 Mar 5. [Epub ahead of print]

Kory W, Jaspersen, Thérèse M. Tuohy, Deborah W. Neklason, Randall W. Burt. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2044–2058.

Labib S, Guo CH, Williams A, Yauk CL, White PA, Halappanavar S. Toxicogenomic outcomes predictive of forestomach carcinogenesis following exposure to benzo(a)pyrene: relevance to human cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(2):269-280.

Li Y, Elashoff D, Oh M, Sinha U, St John MA, Zhou X, Abemayor E, Wong DT. Serum circulating human mRNA profiling and its utility for oral cancer detection. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1754-1760.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343(2):78-85.

Liu Z, Li G, Wei S, Niu J, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2010;116(20):4753-4760.

Lu ZM, Lin YF, Jiang L, Chen LS, Luo XN, Song XH, et al. Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014;7:525-33.

Luo M, Yang F, Huang SX, Kuang ZP, Luo XL, Li YD, Wu JN, Xie YA. Two-stage model of chemically induced hepatocellular carcinoma in mouse. *Oncol Res*. 2013;20(11):517-528.

McKay JD, Truong T, Gaborieau V, Chabrier A, Chuang SC, Byrnes G, et al. A Genome-Wide Association Study of Upper Aerodigestive Tract Cancers Conducted within the INHANCE Consortium 2011 7 (3): e1001333

Messina S, Frati L, Porcellini A. Oxidative stress posttranslationally regulates the expression of Ha-Ras and Ki-Ras in cultured astrocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:792705.

Ni RS, Shen X, Qian X, Yu C, Wu H, Gao X. Detection of differentially expressed genes and association with clinicopathological features in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2012;4(6):1354-1360.

Nunobiki O, Ueda M, Toji E, Yamamoto M, Akashi K, Sato N, et al. Genetic Polymorphism of Cancer Susceptibility Genes and HPV Infection in Cervical Carcinogenesis. *Patholog Res Int*. 2011;2011:364069. Epub 2011 May 31.

Picelli S, Bermejo JL, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Fernández-Rozadilla C, Carracedo A, et al. Meta-Analysis of Mismatch Repair Polymorphisms within the Cogent Consortium for Colorectal Cancer Susceptibility. *PlosOne*. 2013 8 (9): e72091

Sadhu DN, Merchant M, Safe SH, Ramos KS. Modulation of protooncogene expression in rat aortic smooth muscle cells by benzo[a]pyrene. *Arch Biochem Biophys*. 1993;300(1):124-131.

Singhal P, Hussain S, Thakur N, Batra S, Salhan S, Bhambani S, Bharadwaj M. Association of MDM2 and p53 polymorphisms with the advancement of cervical carcinoma. *DNA Cell Biol*. 2013;32(1):19-27. Epub 2012 Dec 4.

Sipeky C, Weber A, Szabo M, Melegh BI, Janicsek I, Tarlos G, et al. High prevalence of CYP2C19\*2 allele in Roma samples: study on Roma and Hungarian population samples with review of the literature. *Mol Biol Rep*. 2013;40(8):4727-4735.

Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port*. 2011;24(1):127-34. Epub 2011 Feb 28.

Summerer I, Niyazi M, Unger K, Pitea A, Zangen V, Hess J, et al. Changes in circulating microRNAs after radiochemotherapy in head and neck cancer patients. *Radiat Oncol*. 2013;8:296.

Tandle AT, Sanghvi V, Saranath D. Determination of p53 genotypes in oral cancer patients from India. *Br J Cancer*. 2001;84:739-742.

Trajkov D, Petlichkovski A, Efinska-Mladenovska O, Hristomanova S, Djulejic E, Kirijas M, et al. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in Roma from the Republic of Macedonia. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2012;11(4):282-93.

Tung EW, Philbrook NA, Belanger CL, Ansari S, Winn LM. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutat Res*. 2014;760:64-69.

Varszegi D, Duga B, Melegh BI, Sumegi K, Kisfali P, Maasz A, Melegh B. Hodgkin Disease Therapy Induced Second Malignancy Susceptibility 6q21 Functional Variants in Roma and Hungarian Population Samples. *Pathol Oncol Res*. Epub 2013 Dec 5.

Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genet*. 2013;206(9-10):340-6.

Yasaei H, Gilham E, Pickles JC, Roberts TP, O'Donovan M, Newbold RF. Carcinogen-specific mutational and epigenetic alterations in INK4A, INK4B and p53 tumour-suppressor genes drive induced senescence bypass in normal diploid mammalian cells. *Oncogene*. 2013;201;32(2):171-179.

Zeng X, Xiang J, Wu M, Xiong W, Tang H, Deng M, et al. Circulating miR-17, miR-20a, miR-29c, and miR-223 combined as non-invasive biomarkers in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(10):e46367.

Zhang K, Civan J, Mukherjee S, Patel F, Yang H. Genetic variations in colorectal cancer risk and clinical outcome. *World J Gastroenterol* 2014; 20(15): 4167-4177.

Zhang S, Feng XL, Shi L, Gong CJ, He ZJ, Wu HJ, Ling TY. Genome-wide analysis of DNA methylation in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1819-26.

Zhao B, Lee EJ, Wong JY, Yeoh PN, Gong NH. Frequency of mutant CYP1A1, NAT2 and GSTM1 alleles in normal Indians and Malays. *Pharmacogenetics.* 1995;5:275-280.